

Der Einfluss des Integrin-Rezeptor-Inhibitors Cilengitide
auf die *Ex-vivo*-Chemoresponse von Kopf-Hals-Tumoren gegenüber
Cisplatin, Docetaxel und Cetuximab im FLAVINO-Assay
mit und ohne Bestrahlung

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Dr. med. dent. Daphne Schlegel
22.08.82, Stuttgart

angefertigt an der: Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-
und Ohrenheilkunde / Plastische Chirurgie
Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. A. Dietz,
Dr. rer. nat. G. Wichmann

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 22.07.2014

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG:	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE DER KOPF-HALS-TUMOREN	1
1.2 HISTOLOGIE UND PATHOLOGIE	2
1.3 AJCC-KLASSIFIKATION	2
1.4 THERAPIE VON HNSCC.....	3
1.4.1 Operation.....	3
1.4.2 Radiotherapie	3
1.4.3 Radiochemotherapie.....	4
1.4.4 Chemotherapie	4
1.4.4.1 Induktionschemotherapie	4
1.4.4.2 Palliative Chemotherapie.....	5
1.4.5 Zytostatika	5
1.4.5.1 Docetaxel.....	5
1.4.5.2 Cisplatin.....	6
1.4.6 Zielgerichtete Therapie (targeted therapy)	6
1.4.6.1 Cetuximab (Erbix © Merck)	7
1.4.6.2 Cilengitide, der Integrininhistor.....	8
1.4.6.3 Klinische Anwendung von Cilengitide	10
1.5 MOLEKULARPATHOLOGISCHE DIAGNOSTIK.....	11
1.6 MODELLE DER CHEMORESPONSETESTUNG	11
1.6.1 Historie.....	11
1.6.2 MTT-Test	12
1.6.3 ATP-Test.....	12
1.6.4 Si-Sensor Chips	12
1.6.5 Flavino-Assay.....	12
1.6.6 Kritische Beurteilung und Anforderungen an einen Assay.....	13
1.7 INTEGRIN-ANTAGONISTEN UND RADIOTHERAPIE.....	14
1.8 FRAGESTELLUNGEN.....	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17

2.1	PATIENTEN	17
2.2	MATERIAL	21
2.2.1	Reagenzien.....	21
2.2.2	Zytostatika	22
2.2.3	Antikörper.....	22
2.2.4	Geräte und Software.....	22
2.2.5	Einmalartikel	23
2.2.6	Glaswaren.....	24
2.3	ZELLINIE KB	24
2.4	METHODEN	24
2.4.1	Flavingeschützte Bedingungen.....	24
2.4.2	Herstellung der Stammlösungen.....	25
2.4.3	Stammlösungen der einzelnen Chemotherapeutika.....	25
2.4.3.1	Cetuximab	25
2.4.3.2	Cilengitide	25
2.4.3.3	Cisplatin (cis-DDP)	25
2.4.3.4	Docetaxel (DTX).....	26
2.4.4	Zellkulturmedium.....	26
2.4.4.1	Flavinfreies Medium RPMI 1640.....	26
2.4.4.2	Tumormedium [TM]	26
2.4.4.3	Verdaumedium	26
2.4.5	Verwendete Lösungen.....	26
2.4.5.1	Blocklösung.....	26
2.4.5.2	Waschlösung	26
2.4.5.3	FKS (fötales Kälberserum).....	27
2.4.6	Antikörper zur Fluoreszenzfärbung.....	27
2.4.6.1	Pancytokeratin-AK	27
2.4.6.2	Cy2 AK conjugated AffiniPur Goat Anti-Mouse IgG.....	27
2.5	EX-VIVO CHEMORESPONSETESTUNG.....	27
2.5.1	Probengewinnung.....	27
2.5.2	Aufbereitung der Proben	27
2.5.3	Chemoresponsetestung mit 96er Mikrotiterplatten	28
2.5.4	Chemoresponse und Bestrahlung	29
2.5.5	Fixierung und Färbung	29
2.5.6	Auswertung.....	30
3	ERGEBNISSE	31

3.1	KOLONIEBILDUNGSVERHALTEN IM KONTROLLMEDIUM.....	31
3.1.1	<i>Koloniebildungsverhalten differenziert nach Alter der Patienten bei der Tumor-</i> <i>biopsie</i>	<i>31</i>
3.1.2	<i>Koloniebildungsverhalten unterteilt nach AJCC-Stadium</i>	<i>31</i>
3.1.3	<i>Koloniebildungsverhalten unterteilt nach dem Grading der Tumorproben.....</i>	<i>32</i>
3.1.4	<i>Koloniebildungsverhalten unterteilt nach Alkoholkonsum.....</i>	<i>32</i>
3.1.5	<i>Koloniebildungsverhalten unterteilt nach Zigarettenkonsum</i>	<i>33</i>
3.1.6	<i>Koloniebildungsverhalten unterteilt nach Lokalisation des Primärtumors</i>	<i>33</i>
3.2	KOLONIEBILDUNG AUF VERSCHIEDENEN EZM-PROTEINEN UND WIRKSAMKEIT VON BESTRAHLUNG OHNE CHEMOTHERAPEUTIKA... 34	
3.2.1	<i>Koloniebildung in Abhängigkeit von EZM-Proteinen bei 41 Tumorproben</i>	<i>34</i>
3.2.2	<i>Koloniebildung in Abhängigkeit von EZM-Proteinen und AJCC-Stadium</i>	<i>36</i>
3.2.3	<i>Koloniebildung in Abhängigkeit von EZM-Proteinen und Alkoholkonsum.....</i>	<i>38</i>
3.2.4	<i>Koloniebildung in Abhängigkeit von EZM-Proteinen und Zigarettenkonsum</i>	<i>39</i>
3.2.5	<i>Kolonieanzahl in Abhängigkeit von EZM-Proteinen und Tumorlokalisation</i>	<i>41</i>
3.3	CHEMORESPONSETESTUNG CILENGITIDE UND CETUXIMAB BEI HNSCC	43
3.3.1	<i>Koloniebildung unter dem Einfluss von Cil und Cetux unterteilt nach Beschichtung</i> <i>und Bestrahlung</i>	<i>43</i>
3.3.2	<i>Koloniebildung unter dem Einfluss von Cil und Cetux unterteilt nach Beschichtung</i> <i>und Bestrahlung in Abhängigkeit der Tumorlokalisation</i>	<i>44</i>
3.4	CHEMORESPONSETESTUNG CISPLATIN UND DOCETAXEL BEI HNSCC	48
3.4.1	<i>Koloniebildung unter dem Einfluss von Cis und DTX unterteilt nach Beschichtung</i> <i>und Bestrahlung</i>	<i>48</i>
3.5	EINFLUSS DER ZYTOSTATIKA CISPLATIN, DOCETAXEL, CETUXIMAB UND CILENGITIDE AUF DAS KOLONIEBILDUNGSVERHALTEN BEI UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN IN BINÄRER KOMBI- NATION	50
3.5.1	<i>Cis und DTX</i>	<i>50</i>
3.5.2	<i>Cil und Cis.....</i>	<i>52</i>
3.5.3	<i>Cil und DTX.....</i>	<i>53</i>
3.5.4	<i>Cetux und DTX</i>	<i>55</i>
3.5.5	<i>Cetux und Cis</i>	<i>56</i>
3.6	EINFLUSS DER ZYTOSTATIKA CISPLATIN, DOCETAXEL, CETUXIMAB UND CILENGITIDE AUF DAS KOLONIEBILDUNGSVERHALTEN BEI	

UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN IN TERTIÄRER KOMBINATION.....	58
3.6.1 <i>Cil, DTX und Cis</i>	58
3.6.2 <i>Cil, Cetux und Cis</i>	60
3.6.3 <i>Cil, Cetux und DTX</i>	61
3.6.4 <i>Cis, Cetux und DTX</i>	62
3.7 EINFLUSS DER ZYTOSTATIKA CISPLATIN, DOCETAXEL, CETUXIMAB UND CILENGITIDE AUF DIE KOLONIEBILDUNG BEI UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN IN QUARTÄRER KOMBINATION.....	64
3.7.1 <i>Cil, Cis, Cetux und DTX</i>	64
4 DISKUSSION	67
4.1 CHEMORESPONSETESTUNG VON HNSCC	67
4.1.1 <i>Koloniebildungsverhalten von HNSCC</i>	67
4.1.2 <i>Kolonieanzahl im Kontrollmedium bei unterschiedlichen Beschichtungen und Einzeitbestrahlung</i>	68
4.1.3 <i>Chemoresponsetestung Cil und Cetux</i>	70
4.1.4 <i>Chemoresponsetestung der Zytostatika Cis, DTX und in Kombination</i>	71
4.1.5 <i>Cil, Cetux, Cis und DTX in tertiärer und quartärer Kombination in Bezug auf Koloniebildungsverhalten</i>	73
4.1.6 <i>Vorteile von Cil in binärer, tertiärer und quartärer Kombination</i>	75
4.1.7 <i>Vorteile von Cetux in binärer, tertiärer und quartärer Kombination</i>	77
4.1.8 <i>Wirkung der Chemotherapie bei zusätzlicher Bestrahlung</i>	80
4.2 BEWERTUNG DER GEWONNEN ERGEBNISSE	83
5 ZUSAMMENFASSUNG	85
6 LITERATURVERZEICHNIS	89
7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	98
8 TABELLENVERZEICHNIS	105
9 ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG DER ARBEIT ...	107
10 DANKSAGUNG	108
11 ANHANG	109
11.1 PIPETTIERSCHEMA.....	109

Bibliographische Beschreibung:

Dr. med. dent. Daphne Schlegel

Titel der Arbeit

Der Einfluss des Integrin-Rezeptor-Inhibitors Cilengitide auf die *Ex-vivo* Chemoresponse von Kopf-Hals-Tumoren gegenüber Cisplatin, Docetaxel und Cetuximab im FLAVINO-Assay mit und ohne Bestrahlung

Universität Leipzig, Dissertation

111 S., 112 Lit., 48 Abb., 23 Tab., 1 Anlage

Referat:

An 100 Tumorproben mit HNSCC (*head and neck squamous cell carcinoma*) von 92 Patienten wurde mit Hilfe des FLAVINO-Assays erstmalig das Adhärenzverhalten von Plattenepithelzellen bei unterschiedlichen Beschichtungen untersucht und anschließend eine *Ex-vivo*-Chemoresponsestestung durchgeführt. Hierbei kamen als Beschichtungsproteine humanes Laminin [L], humanes Fibronektin [hFN], Kollagen I [K] aus Rattenschwänzen und eine vorteilhafte Mischung aus unterschiedlichen extrazellulären Proteinen [ECM] zur Anwendung. Zusätzlich wurde eine ECM-Platte noch mit 2,2 Gy einmalig bestrahlt. Ziel der Chemoresponsestestung war es, den Einfluss des Integrin-Inhibitor Cilengitide [Cil] auf HNSCC gegenüber den Standardtherapeutika Cisplatin [Cis], Docetaxel [DTX] und Cetuximab [Cetux] zu testen und letztendlich eine optimale Kombination zur Verbesserung der Prognose für HNSCC zu gewinnen. 41% der Tumorproben zeigten ein Koloniewachstum, wobei die höchste Koloniebildung auf der bestrahlten ECM-Beschichtung ausgezählt werden konnte, dicht gefolgt von der Kollagenbeschichtung. 10 μM Cil als Monotherapie konnten bei HNSCC eine Koloniereduktion von 23% erzielen, 66,6 $\mu\text{g/ml}$ Cetux von 53% und beide in Kombination 55%. Cis als potente Monosubstanz in Verwendung 6,667 μM erzielten eine fast vollständige Koloniereduktion von 96%, wohingegen 550 nm DTX nur 66% Reduktion erreichten. In binärer, tertiärer und quartärer Kombination aller vier Chemotherapeutika ist nur eine komplette Koloniereduktion zu erreichen, wenn Cis in der Dosierung 6,667 μM verwendet wird. Cil in Kombination mit DTX, Cetux und Cis konnte nach zusätzlicher Bestrahlung eine 100%ige Koloniereduktion erreichen und kann somit als potenter Radiosensitizer angesehen werden.

Abkürzungsverzeichnis

HNSCC = head and neck squamous cell carcinoma

L = humanes Laminin

hFN = humanes Fibronectin

K = Kollagen I

ECM = extrazelluläre Matrixproteine

ECM-B= extrazelluläre Matrixproteine mit anschließender Bestrahlung (2,2 Gy)

Cil = Cilengitide

Cis = Cisplatin

DTX = Docetaxel

Cetux = Cetuximab

TPL = tolerated plasma level

FLAVINO-Assay = short-time ex vivo colony-forming assay-flavin protecting conditions

HPV = humanes Papillomvirus

Gy = Gray

5-FU = 5-Fluorouracil

PY = Pack Years

Abb.= Abbildung

Tab.= Tabelle

SIN = squamous intraepithelial neoplasia

AJCC = American Joint Committee on Cancer

RChT = Radiochemotherapie

sog. = sogenannt

FKS = fötales Kälberserum

max. = maximal

min = Minuten

PBS = phosphate buffered saline

TM = Tumormedium

1 Einleitung

In Deutschland erkranken jährlich etwa 2.800 Frauen und etwa 7.600 Männer an malignen Kopf-Hals-Tumoren (Robert-Koch-Institut, 2010). In Europa sind etwa 650.000 Neuerkrankungen und mehr als 350.000 Todesfälle auf Kopf-Hals-Tumoren zurückzuführen (Guntinas-Lichius, 2010). Weltweit findet man in Asien die höchste Inzidenz (Wannemacher et al., 2006). Die weitaus überwiegende Zahl der Kopf-Hals-Tumore sind Plattenepithelkarzinome (*head and neck squamous cell carcinoma [HNSCC]*). Die Prognose der an HNSCC Erkrankten ist unverändert schlecht; die Verbesserung des Fünfjahresüberlebens, das bei anderen Tumorentitäten gesehen wird, ist bei HNSCC-Patienten allgemein nicht zu verzeichnen, obwohl multimodale Therapiekonzepte unter Dosisescalation und Hinzunahme weiterer Therapeutika in klinischen Studien nachgewiesene verbesserte Wirksamkeit haben. Moderne Therapiekonzepte unter zusätzlicher Nutzung zielgerichteter Therapeutika gegenüber Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren, beispielsweise monoklonaler Antikörper wie Cetuximab, der den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (EGFR1) bindet und Wachstum, insbesondere der malignen epithelialen Zellen unterdrücken kann, versprechen eine Steigerung der Wirksamkeit durch spezifische Einflussnahme auf den Tumor und sein Wachstum. Mehrere zielgerichtete Therapien mit konventionellen Zytostatika kombiniert einzusetzen, könnte ein Weg sein, HNSCC besser zu therapieren. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Integrin-Rezeptor-Inhibitors Cilengitide auf die *Ex-vivo*-Chemoresponse von Kopf-Hals-Tumoren gegenüber Cisplatin, Docetaxel und Cetuximab im FLAVINO-Assay mit und ohne Bestrahlung untersucht.

1.1 Epidemiologie und Ätiologie der Kopf-Hals-Tumoren

Seit 1990 sind die altersadaptierten Erkrankungs- und Sterberaten an malignen Kopf-Halstumoren bei den Frauen etwa konstant, bei den Männern jedoch deutlich rückläufig. Bei den 5-Jahres-Überlebensraten erreichen die Frauen heute 55%, die Männer lediglich 47%. Gründe für die in den letzten 30 Jahren nicht signifikante Verbesserung der Überlebensrate liegen in der bei Erstvorstellung vergleichsweise früh eintretenden primären lokoregionären Metastasierung bei 50% bis 60% der Patienten mit resektablen Tumoren. Ferner entwickeln etwa 10% der Patienten Fernmetastasen oder Zweitmalignome (Link, 2009). Risikofaktoren für diese maligne Entität sind vor allem der Abusus von Alkohol und Nikotin, der bei „mindestens drei Viertel der Patienten“ vorliegt (Link, 2009). Diätetische Faktoren, mangelnde Mundhygiene und ein niedriges sozio-ökonomisches Milieu sind weitere Risikofaktoren. Neuere Ergebnisse legen nahe, dass eine Infektion mit HPV (humanes Papillomvirus), insbe-

sondere der Subtypen HPV-16 und HPV-18, ebenfalls als Risikofaktor zu gelten hat (Singhi & Westra, 2010). Der Zusammenhang zwischen EBV-Infektion (Epstein-Barr-Virus) und dem Vorliegen eines Nasopharynxkarzinoms gilt ebenfalls als geklärt. Nicht vergessen werden darf die genetische Prädisposition; denn es besteht bei Verwandten ersten Grades der Patienten ein zwei- bis vierfach höheres Risiko, ein Kopf-Hals-Karzinom zu entwickeln (Link, 2009).

1.2 Histologie und Pathologie

Die meisten malignen Kopf-Hals-Tumore sind Plattenepithelkarzinome (HNSCC), die histologisch sub-differenziert werden können (spindelzellige, verruköse, basaloide). Weitaus seltener liegen auch lymphoepitheliale und undifferenzierte Karzinome vor. Die HNSCC entwickeln sich aus intraepithelialen Neoplasien (*squamous intraepithelial neoplasia*, SIN), die gemäß ihrer Entdifferenzierung in die Grade 1, 2 und 3 (SIN I, II und III) klassifiziert werden. Nach der histomorphologischen Differenzierung unterscheidet man bei den HNSCC folgende 4 Malignitätsgrade: Grad 1: gut differenziert; Grad 2: mäßig differenziert; Grad 3: schlecht differenziert; Grad 4: undifferenziert. Je höher der Malignitätsgrad, desto höher die meist atypische Mitoserate und die Kernpleomorphie.

1.3 AJCC-Klassifikation

In der TNM-Klassifikation werden die einzelnen Tumoren nach ihrer Größe (T), nach dem Lymphknotenbefall (N) und nach den Fernmetastasen (M) unterschieden. Durch Zusammenfassung aller drei Kriterien ergibt sich die in Tabelle 1 wiedergegebene Einteilung nach Stadien entsprechend vereinheitlichter internationaler Klassifikation (*American Joint Committee on Cancer, AJCC*) (Robbins et al., 2008).

Tab.1 Stadieneinteilung nach AJCC

Stadium I	T1 N0 M0
Stadium II	T2 N0 M0
Stadium III	T1-2 N1 M0; T3 N0-1 M0
Stadium IVA	T4a N0-1 M0; T1-4a N2 M0
Stadium IVB	T4b jedes N M0; jedes T N3 M0
Stadium IVC	jedes T jedes N M1

1.4 Therapie von HNSCC

1.4.1 Operation

Bei resektablen Primärtumoren und resektablen lokoregionären Halslymphknoten und gegebenenfalls resektablen Fernmetastasen ist die kurative Operation immer indiziert (Dietz, 2009). Bei frühen Tumorstadien (T1, T2) könnte alternativ eine lokoregionäre Strahlentherapie mit kurativen Dosen vergleichbare Ergebnisse erzielen (Wannemacher et al., 2006). Bei der Operation fortgeschrittener Tumoren ab T3 wird neben der Primärtumorentfernung in der Regel auch eine selektive Ausräumung potentiell vorhandener lokoregionärer Metastasen in den Lymphabflussgebieten durchgeführt (*Neck dissection*). Liegt der Verdacht einer gewebeinfiltrierenden Lymphknotenmetastasierung vor, sollte eine radikale *Neck dissection* mit Ausräumung der Level I-IV und aller infiltrierten Strukturen inklusive Gefäßen, Nerven und *M. sternocleidomastoideus* erfolgen.

1.4.2 Radiotherapie

Die primäre Radiotherapie beinhaltet in der Regel als Zielvolumen den Primärtumor und die zervikalen und supraklavikulären Lymphabflusswege beidseits. Eine adjuvante Radiatio sollte postoperativ bei Tumoren der Stadien III und IV standardmäßig erfolgen (Dietzsch & Kortmann, 2009), vor allem bei lokal fortgeschrittenen Tumoren (pT3 oder > pN1) oder bei Vorliegen von Risikofaktoren (Nerveninfiltration durch den Tumor, R1 oder R2 etc.) (Peters et al., 1993). Die kurativ applizierten Dosen liegen zwischen 50 und 70 Gy. So kann im Anschluss an eine Operation mit R0-Resektion eine durchgeführte Radiatio bzw. Radiochemotherapie die besten Überlebensraten erzielen. Die Wirkungsmechanismen der Bestrahlung beruhen neben der Zerstörung von Doppelstrang-DNA auch auf einer Beeinflussung einer Vielzahl von tumorwachstumsfördernden Signaltransduktionswegen. Daraus folgt eine Überlastung der Reparaturprozesse bei schnell proliferierenden Geweben. Die Bestrahlung erfordert im kurativen Ansatz jedoch eine vergleichsweise hohe Summendosis ohne Überschreitung kritischer Größen für die Einzeldosis. Dies liefert die Rationale für die Fraktionierung der Bestrahlung (kleine Einzeldosen) und genaue Definition des Zielvolumens, um Beeinträchtigungen des umgebenden Gewebes zu minimieren. Die beste Dosisverteilung, insbesondere zum Erhalt der Speicheldrüsenfunktion, ist von einer intensitätsmodulierten Bestrahlung zu erwarten. Mit der IMAT-Methode (*Intensitätsmodulierte Arc-Therapie*) gelingt es, diese Regionen intensitätsmoduliert schnell und schonend zu bestrahlen, insbesondere im Double Arc Mode. Nach Verbakel et al. ist diese Technik schnell, sicher und genau; sie benötigt deutlich weniger MU's (*monitor units*) als die konventionelle IMRT-Technik (2009).

1.4.3 Radiochemotherapie

Bei der simultanen Applikation von Bestrahlung und Chemotherapie wird ein synergistischer Effekt angestrebt. Um die antitumoröse Wirkung zu steigern, wird auch eine erhöhte Nebenwirkungsrate in Kauf genommen. Die Metaanalyse mit 63 Studien von Pignon, Bourhis, Domenge et al., konnte einen absoluten Überlebensvorteil von 4% nach 2-5 Jahren nach Radiochemotherapie nachweisen (2000). Die durch die Eskalation der Therapie unter Hinzunahme von mehreren Chemotherapeutika und die durch die kombinierte Radiochemotherapie (RChT) induzierte erhöhte akute Toxizität ist inzwischen in Grenzbereiche vorgestoßen, die diese Form der Therapie nur für ausgewählte Patienten mit gutem Allgemeinzustand durchführbar macht. Die unter diesen Bedingungen nur begrenzt nutzbaren Vorteile simultaner RChT werden aber über die ebenfalls hohen Raten chronischer (Langzeit-) Toxizität weiter relativiert, weshalb ihre Überlegenheit bezüglich des Gesamtüberlebens in anderer Hinsicht wie bspw. Erhaltung funktionierender Organe als (ggf.) zu teuer erkaufte zu werten ist. Bei Inoperabilität von HNSCC und deren Rezidiven ist bei gegebenen Strahlenreserven die Indikation zur Radiochemotherapie gegeben (Dietz, 2009). In München werden derzeit Patienten für eine multizentrische Studie randomisiert, in der nachgewiesen werden soll, ob mit einer gezielten lokalen Dosisescalation in den hypoxischen Bereichen des Tumors sich die Prognose der Radio-Chemotherapie (Cisplatin) verbessern lässt (Pigorsch, 2009).

1.4.4 Chemotherapie

Generell zu unterscheiden sind die Chemotherapieprotokolle mit kurativem Ansatz, die allgemein eine Kombination mit Bestrahlung (simultan oder sukzessiv) oder Chirurgie vorsehen, oder Protokolle zur Therapie fortgeschrittener HNSCC mit alleiniger Chemotherapie in palliativer Situation.

1.4.4.1 Induktionschemotherapie

Bei einer zytostatischen Therapie sollen so viele neoplastische Zellen wie möglich zerstört werden, um möglichst eine komplette Remission zu erzielen. Bei erfolgreicher Induktionstherapie wird in der Regel auch die Überlebenszeit der Patienten verlängert. Im Anschluss erfolgt bei ausgewählten Fällen auch eine Konsolidierungs- oder Erhaltungstherapie. Die mediane Überlebenszeit von Patienten mit lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren konnte durch eine Induktionstherapie mit einer Dreifachkombination aus Docetaxel/Cisplatin/5-FU auf 71 Monate im Vergleich zu 30 Monaten nach Therapie mit Cisplatin/5-FU verlängert werden (Vermorken et al., 2007). Die Induktionstherapie ist indiziert bei Patienten mit fortgeschritte-

nem Larynxkarzinom bei Organerhaltung und wenn es fraglich ist, ob das Mindestmaß an tumorfreien Resektionsrändern (R0) eingehalten werden kann (Link, 2009).

1.4.4.2 Palliative Chemotherapie

Die palliative Chemotherapie wird mit Präparatekombinationen oder insbesondere bei sehr schlechtem Allgemeinzustand der Patienten mit Monotherapien durchgeführt. Substanzen, die sich bei HNO-Tumoren bewährt haben, sind Cisplatin, 5-Fluorouracil (5-FU), Mitomycin C, Docetaxel und Ifosfamid (Rathore et al., 2010). Patienten befinden sich in einer palliativen Situation wenn ihr HNO-Tumor bereits metastasiert ist oder ein Rezidiv vorliegt. Zuerst beinhaltet das Therapieregime eine meist auf platin-basierte „Firstline“-Chemotherapie, wenn dies von den Patienten ausreichend toleriert wird. Hier kommt meist die Kombination Cisplatin und 5-FU bzw. nach der CeFCiD-Studie, die in 30 deutschen Zentren darunter auch in der HNO Leipzig durchgeführt wird, Cisplatin (40 mg/m^2), 5-FU (2000 mg/m^2) und Cetuximab (250 mg/m^2) mit oder ohne Docetaxel (40 mg/m^2) zum Einsatz. Nach einer ersten Interimsanalyse an 20 Patienten wurde die Dosierung von Cisplatin auf 30 mg/m^2 bzw. von 5-FU auf 1000 mg/m^2 reduziert, da die ursprüngliche Dosierung einen hämatologischen und gastrointestinalen Toxizitätsgrad III/IV aufwies. Diese Dosisreduktion wurde nach einer zweiten Interimsanalyse an 40 Patienten als tolerabel definiert und in der Studie weiter angewandt (Knoedler et al., 2013).

Wird eine Kombinationstherapie vom Patienten nicht toleriert, kommt eine Monotherapie meist mit Cisplatin zum Einsatz. Bringt eine „Firstline“-Chemotherapie nicht den erhofften Therapieerfolg, nämlich den Stillstand des Tumorwachstums bzw. eine Reduktion des Tumolvolumens, folgt eine „Secondline“-Chemotherapie. Hierbei kommen die Medikamente Methotrexat, Mitomycin C und Docetaxel als Monotherapie bevorzugt zur Anwendung.

1.4.5 Zytostatika

1.4.5.1 Docetaxel

Die antineoplastische Wirkung der aus europäischen Eiben (*Taxus baccata* L.) gewonnenen Taxane beruht auf einer gesteigerten Polymerisation von Tubulin zu stabilen Mikrotubuli. Gleichzeitig tritt eine Hemmung der Depolymerisation ein, die zu einer deutlichen Abnahme an freiem Tubulin führt. Bei der Anlagerung von Docetaxel an die Mikrotubuli bleibt die Anzahl der Protofilamente konstant. Bei *In-vitro*-Untersuchungen zeigte es sich, dass das mikrotubuläre Netzwerk durch den Einfluss von Docetaxel zerstört wird und somit lebenswichtige Zellfunktionen der Mitose- und Interphasen verloren gehen. In Kombination mit Cisplatin und

5-FU wird Docetaxel in der Induktionstherapie bei fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich angewandt (Sanofi aventis, 2009).

1.4.5.2 Cisplatin

Cisplatin (Cis-diammindichloridoplatin (II)) ist eines der bei Plattenepithelkarzinomen wirksamsten Chemotherapeutika und spielt daher klinisch eine dominante Rolle bei einer großen Zahl von soliden Tumoren (Kopf-Hals-Tumoren, Ovarialkarzinome und Hodentumore). Cisplatin wirkt ähnlich wie bifunktionelle Alkylantien auf DNA-Basis. Der Aqua-Cisplatin-Komplex weist eine hohe Elektrophilie auf und reagiert bevorzugt mit dem N₇-Atom von Guanin und Adenin. Mittels Querverknüpfung (Intrastrang und Interstrang) beider DNA-Stränge hemmt es deren Replikation und inaktiviert sie. Cisplatin bewirkt ebenfalls zahlreiche Punktmutationen und hemmt die Telomeraseaktivität. Der Zellstoffwechsel kommt zum Erliegen und die Zelle leitet die Apoptose ein (Siddik, 2003). Klinische Studien ergaben, dass eine Störung in der p53-Funktion wider Erwarten zu einer Erhöhung der Tumorzellsensibilität gegenüber Cisplatin führt und nicht zu einer Resistenz (Hawkins et al., 1996). Es besteht kein Zweifel darin, dass Cisplatin ein wirksamer Apoptoseaktivator ist (Henkels & Turchi, 1997), allerdings gibt es auch Daten, dass die Herunterregulierung der Apoptose bei den Tumorzellen mit TP53 Mutation relevant für die Cisplatin-Resistenz ist (Righett et al., 1999).

Es konnte im kurativen Ansatz bei primär inoperablen HNSCC im Vergleich zu einer Therapie mit Cisplatin/5-FU mit der Kombination Docetaxel/Cisplatin/5-Fluorouracil (TPF) eine Reduktion des Risikos für lokale Rezidive und Fernmetastasen, sowie eine von 14,5 auf 18,8 Monate verlängerte mediane Überlebenszeit nachgewiesen werden (Vermorken et al., 2007). Eine Cisplatin-basierte Chemotherapie forciert die Wirkung der Strahlentherapie und ist als primäre Therapie Standard bei Patienten mit (funktionell) inoperablen fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren (Stadium III und IV nach AJCC) und in der adjuvanten Therapie nach Chirurgie insbesondere bei Vorliegen von Risikofaktoren wie extrakapsuläres Tumorwachstum und lokoregionären Lymphknotenmetastasen.

1.4.6 Zielgerichtete Therapie (*targeted therapy*)

Eine zielgerichtete Therapie setzt ein spezifisches molekulares Angriffsziel oder eine Zielstruktur voraus. Diese Voraussetzung erfüllte bereits um 1950 die Therapie mit 5-FU, die spezifisch die Thymidilatsynthetase hemmt. Bei HNSCC spielt die Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 1 (EGFR1 oder EGFR), der Rezeptor-Tyrosinkinaseaktivität besitzt, eine bedeutende Rolle, weshalb der EGFR ein therapeutisches Target darstellt. Für die Wirksamkeit einer zielgerichteten Therapie (*targeted therapy*) ist von

besonderer Bedeutung, bei Tumorentitäten mit hoher Frequenz von Mutationen im nachfolgend (downstream) gelegenen Signaltransduktionsweg, wie dies beim Kolonkarzinom der Fall ist, vor Einsatz bspw. von Panitumumab (Vectibix®) oder Cetuximab (Erbix®) eine molekularpathologische Diagnostik des Tumors auf Vorhandensein von K-RAS (Kirsten-ras-Onkogen) Mutation (Tannapfel, 2008) durchzuführen, da sonst die kostenintensive Therapie unwirksam ist (Barth, 2008). Da im Gegensatz zum Kolonkarzinom beim HNSCC eine weit aus geringere Frequenz von mutiertem *ras* und *raf* unterhalb 10% vorliegt, ist diese Diagnostik bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region nicht zielführend.

1.4.6.1 Cetuximab (Erbix © Merck)

Die Wirkung dieses spezifisch wirkenden monoklonalen Antikörpers liegt in der Hemmung der EGFR (*epidermal growth factor-receptor*)-Aktivierung durch Hemmung der Dimerisation, der Inhibierung der nachfolgenden Signaltransduktion und dem dadurch unterdrückten proliferationsfördernden Effekt, sowie der nach Internalisierung sich anschließenden Degradation, die zur Präsentation von Peptiden des Antikörpers und erhöhter Immunreaktivität führen kann (Li S, 2005). Über 90% der Plattenepithelkarzinome überexprimieren diesen funktionell aktiven EGFR. Die EGFR-Familie umfasst vier transmembranäre Rezeptoren: EGFR (HER1/erbB-1), HER2 (erbB-2/neu), HER3 (erbB-3) und HER4 (erbB-4) (Yarden & Sliwkowski, 2001). Bisher wurden 7 Liganden entdeckt, die an den EGFR binden; der wichtigste hiervon ist EGF. Nach Ligandenbindung am EGFR und Dimerisierung der Rezeptor-monomere wird ihre intrinsische Tyrosinkinase aktiviert, die in der intrazellulären Domäne jedes Rezeptormonomers lokalisiert ist. Deren Aktivierung erfolgt durch Transphosphorylierung der Tyrosinreste des Rezeptordimers. Zytoplasmatische Botenproteine docken an die phosphorylierte Stelle an und aktivieren eine Reihe von Signalkaskaden. Das Ergebnis dieser Kaskadenaktivierung ist die Änderung im Expressionsmuster von Genen für Zellregulation und Zelldifferenzierung, aber auch Steuerung der Metastasierung und der Angiogenese. Die Überexpression von EGFR auf Tumorzellen ist assoziiert mit einer schlechten Prognose und einer Therapieresistenz (Harding & Burtneß, 2005). Daher stellen der EGFR und dessen Tyrosinkinasen geeignete therapeutische Zielstrukturen dar. 70-80% der Patienten bekamen nach der Therapie mit Cetuximab ein Arzneimittelexanthem: dies war signifikant mit dem Ansprechen auf die Therapie und auch mit einer höheren Überlebensrate assoziiert (Burtneß, 2005).

Die für Cetuximab zulassungsrelevante Bonner-Studie ergab, dass die Kombination der primären Strahlentherapie mit Cetuximab wirksamer ist, als die Strahlentherapie allein (Bonner et al., 2006). In einer anderen Studie wurde bei 23 behandelten Patienten durch eine Stan-

dardchemotherapie mit der zusätzlichen Gabe von Cetuximab eine komplette Remission bei 65% der Patienten erzielt (Merlano et al., 2007). Cetuximab konnte in Kombination mit Cisplatin oder Carboplatin und 5-FU (PFE) das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben von Patienten im Vergleich zu einer alleinigen Chemotherapie (PF) deutlich verlängern (Vermorken et al., 2008). Die vorliegenden Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Kombination von Bestrahlung, Chemotherapie mit Cisplatin/Carboplatin und 5-FU und Gabe von Cetuximab beim fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumor die besten Ergebnisse erwarten lässt. Die EXTREMEa-Studie (*ErbituX in 1st-line Treatment of REcurrent or METastatic head and neck cancer*) konnte beweisen, dass Cetuximab das Überleben der Patienten mit rezidierten und/oder metastasierten Kopf-Hals-Tumoren in der Erstlinientherapie signifikant verlängern kann (Winer, 2009). Im November 2008 wurde die Zulassung europaweit auf die Kombinationsbehandlung mit einer platinbasierten Standardchemotherapie bei Patienten mit rezidierten und/oder metastasierten Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und des Halses ausgeweitet.

1.4.6.2 Cilengitide, der Integrininhibitor

Die vor mehr als 20 Jahren entdeckten Integrine (Tamkun et al., 1986) sind als membranständige Rezeptoren multifunktionale Adhäsionsmoleküle, die eine Schlüsselrolle bei der Regulation des embryonalen Wachstums, bei der Apoptose, bei der Entzündungsantwort, bei der Onkogenese und bei der Metastasierung spielen, da sie für die Interaktion der Zellen mit der extrazellulären Matrix essentiell sind und bei Ligation eine Signaltransduktion erfolgt, die wesentlichen Einfluss auf die Morphologie der Zelle, ihr Wachstum und eine Vielzahl weiterer biologischer Funktionen ausübt. Integrinrezeptoren erlauben auch das Anheften wandernder, vom Primärtumor abgespaltener Krebszellen an Matrixproteinen (Kettembeil, 2009). Integrine und assoziierte Signalmoleküle sind attraktive *Targets* einer pharmakologischen Blockade mit *small molecules*, um eine Verbesserung der Radio- und Chemotherapie zu erreichen (Cordes et al., 2009). Integrine kommen in allen tierischen Zellen vor (Ausnahme: Erythrozyten). Die Bindung der Integrine an benachbarten Zellen oder der extrazellulären Matrix [EZM] ist eine spezifische Bindung und aktiviert differente intrazelluläre Signalwege (Clark & Brugge, 1995). Natürliche Integrinliganden sind Fibrinogen und Fibrin, Thrombospondin, MMP-2 und der Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (Stupp & Ruegg, 2007). Bei Liganandenbindung werden interzelluläre Signalwege wie Ras-MAPK, PI3K-PKB-mTOR und kleine GTPasen (d.h. Rho, Rac) aktiviert (Hynes, 2002). Integrinrezeptoren verknüpfen als Transmembranproteine extrazelluläre Gerüststrukturen mit intrazellulären (Zytoskelett) und kodieren Zellkontakte in intrazelluläre Signale (Krauss, 2000) um. Der umgekehrte Weg einer Sig-

nalvermittlung an eine benachbarte Zelle kann ebenfalls durch Integrinrezeptoren bewerkstelligt werden (Kettembeil, 2009). Bei der Onkogenese spielt die durch die malignen Zellen induzierte Angiogenese eine wichtige Rolle. Relevant sind hierbei insbesondere die proangiogenetischen Faktoren *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* und *basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)* wachsender Tumoren. Neu formierte tumorversorgende Gefäße bzw. deren Endothelzellen finden mit Hilfe der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Anschluss an die EZM und werden dementsprechend vor allem in wachsenden tumorassoziierten Endothelzellen gefunden (Max et al., 1997). *In-vivo*- Modelle konnten zeigen, dass VEGF mit verstärkter $\alpha_v\beta_3$ -Expression vergesellschaftet ist, während $\alpha_v\beta_5$ eher durch bFGF gefördert wird (Li et al., 1998).

Ihrer Struktur nach sind Integrine heterodimere Glykoproteine. Bislang sind 18 α -Ketten und 8 β -Ketten im menschlichen Genom bekannt, die 24 Kombinationsarten von Integrinen bilden (Shakibaei et al., 2008). Die β -Untereinheit ist wahrscheinlich der Hauptbindungsort für die Signalmoleküle des Zytoskeletts und des Extrazellulärraums. Dagegen spielt die α -Untereinheit eine Rolle bei der Regulation (Albelda & Buck, 1990). Die Integrine erkennen das Dreierpeptid der Aminosäuren Arg-Gly-Asp (**RGD**), die charakteristische RGD-Sequenz. Die Ligandenspezifität hängt von der Interaktion vorhandener Strukturen beider Untereinheiten ab (Buck & Horwitz, 1987). Die RGD-Sequenz findet sich in extrazellulären Matrixproteinen wie Fibrinogen, Vitronektin und Fibronektin, die wichtig sind für die Wundheilung und die Blutgerinnung. Integrine mit β_1 oder β_3 -Ketten gehören zu den EZM-Rezeptoren (Clark R., 1990). Viele Beobachtungen legen nahe, dass Integrine auch mit Wachstumsfaktoren interagieren und dies für die Zellfunktion wichtig ist, insbesondere für die Adhäsion, die Differenzierung und für andere biologische Prozesse bei verschiedenen Zelltypen (Mainiero et al., 1996). Interessanterweise weist der epidermale Wachstumsfaktor eine Sequenz von etwa 30-40 Aminosäureresten auf, die sich in Annäherung ebenfalls in der Primärstruktur der Integrine wiederfinden. Dieses EGF-Muster besteht ebenfalls bei einer großen Zahl von β_1 -Integrinliganden, vor allem bei EZM-Proteinen. Ihrer verschiedenen biologischen Wirkungen wegen zählen die Integrine zu den am subtilsten studierten und bestverstandenen Adhäsionsmolekülen bei Säugerzellen (Shakibaei et al., 2008).

Die Wirksamkeit von Cilengitide (EMD 121974, Cyclo-L-Arg-Gly-L-Asp-D-Phe-N (me) L-Val, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) als Integrininhibitor beruht auf seiner RGD Sequenz; zwei weitere Aminosäuren erlauben den Ringschluss und die Stabilisierung des Penta-peptides. Cilengitide dockt über die Aminosäure Arginin an die α -Integrin-Untereinheit [UE] an und mittels der Aminosäure Aspartat an die β -UE. Cilengitide hemmt die Integrine $\alpha_v\beta_3$

und $\alpha_v\beta_5$, deren Haupteigenschaft die Neoangiogenese von malignen Tumorzellen darstellt. Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ befindet sich in geringer Menge auf ruhenden Endothelzellen, während es in besonderer Weise die Angiogenese von Endothelzellen in Granulationsgeweben und Krebszellen fördert (Alghisi & Rüegg, 2006). Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist interessanterweise vermehrt aktiviert während der vertikalen Wachstumsphase und Metastasierung von malignen Tumorzellen (Albeda et al., 1990). Tumorzellen senden Wachstumsfaktoren an benachbarte Endothelzellen aus und regen sie an, auf ihrer Oberfläche Integrine zu exprimieren, die dann die Angiogenese des Tumors aktivieren. Cilengitide kann diese Integrine blockieren und so eine Hemmung der Angiogenese (Link, 2009), des Tumorwachstums und der Zellregulation erreichen. Die Vorteile der zyklischen RGD-Peptide wie Cilengitide liegen in ihrer einfachen Synthese, ihrer Widerstandskraft gegen Proteolyse bei schwacher Immunogenität. Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist vergesellschaftet mit der Matrix-Metallo-Proteinase (MMP-2) und trägt zu einem invasiven Wachstumsverhalten von Tumorzellen bei. Diese maligne Invasion wird ebenfalls durch Cilengitide unterdrückt (Silletti et al., 2001).

Jedoch bestehen derzeit Bedenken bezüglich der klinischen Wirksamkeit des Integrininhibitors Cilengitide. So wird das Ziel, nur die $\alpha_v\beta_3$ oder $\alpha_v\beta_5$ Rezeptoren zu blockieren, in Frage gestellt, da es noch andere Integrine gibt ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$), die ebenfalls mit der Angiogenese assoziiert sind, wie in experimentellen Studien nachgewiesen wurde und ggf. $\alpha_v\beta_3$ oder $\alpha_v\beta_5$ substituieren könn(t)en. Es existiert derzeit kein verlässliches Untersuchungsverfahren, die Angiogenese von Tumoren unabhängig von der physiologischen Angiogenese zu messen und zu vergleichen (Jubb et al., 2006).

1.4.6.3 Klinische Anwendung von Cilengitide

Im Rahmen der zwei-armigen CENTRIC-Studie (*CilENgitide in combination with Temozolomide and Radiotherapy In newly diagnosed glioblastoma Phase III randomized Clinical trial*) sollen ungefähr 500 Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom und dem Promotorgen MGMT (Methyl-Guanin-Methyltransferase) randomisiert therapiert werden. Während die eine Gruppe eine Standardbehandlung mit Temozolomid und Radiatio erhält, wird der Vergleichsgruppe zusätzlich Cilengitide appliziert. Geprüft wird das Gesamtüberleben (OS) als primärer Endpunkt, sekundär das progressionsfreie Überleben (PFS), besonders das 6-Monats-PFS, die Sicherheit, die Verträglichkeit, die Pharmakokinetik und die Lebensqualität unter Cilengitidegabe. Diese Studie wird auch an der Universität Leipzig unter Herrn Prof. Kortmann durchgeführt. Die Ergebnisse der Phase III stehen noch aus. Die vorläufigen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Cilengitide gut verträglich ist und die Prognose verbessert, vor allem bei Patienten mit geringer Expression des Promotorgens MGMT (Reardon et

al., 2008). Die bereits 2008 konzipierte ADVANTAGE-Studie von Merck Serono mit Cilengitide in Kombination mit Cetuximab und einer platinbasierten Chemotherapie erbrachte in der Phase I an 10 Patienten erste klinische Ergebnisse. Bei einer 100%igen Tumorkontrollrate wurde keine dosislimitierende Toxizität festgestellt. Somit kam man zu dem Schluss, dass eine Kombinationstherapie mit 2000 mg Cilengitide von den Patienten gut toleriert wird. Deshalb wurde eine Phase II begonnen (Vermorken et al., 2011).

1.5 Molekularpathologische Diagnostik

Um ein besseres Ansprechen auf eine multimodale Radiochemotherapie zu erreichen, wurden in einem allgemeinen Konsens von Lefebvre und Ang multiple Biomarkerstudien (p53-Mutation, E-Cadherin, Epiregulin etc.) empfohlen (2009). Unglücklicherweise zeigen all diese Biomarker nur eine ungenaue Korrelation zur klinischen Response auf Radio- und/oder Chemotherapie und weisen eine Abhängigkeit von diversen Begleitumständen auf. Selbst bei Zelllinien ergibt sich kein einheitliches Bild. Es fehlt derzeit speziell noch an individuellen patientenbezogenen Untersuchungen, um den Erfolg einer nicht-chirurgischen Behandlung voraussagen zu können (Dietz et al., 2010). Einen Weg, diese Lücke zu schließen und bei fehlenden prädiktiven Biomarkern die Unsicherheit bezüglich des Ansprechens auf eine pharmakologische Therapie zu reduzieren, könnte die Chemoresponsestestung von Biopsaten darstellen.

1.6 Modelle der Chemoresponsestestung

1.6.1 Historie

In-vitro-Chemoresponse-Tests gab es bereits zum Ende des 19. Jahrhunderts. 1953 berichteten Black und Spear als erste über *In-vitro*-Assays für maligne Zellen. Kurz darauf entwickelten Marcus und Puck ein spezielles Assaysystem auf Agarbasis zur Bestimmung des malignen Zellwachstums. Klinische Untersuchungen erbrachten ab 1990 den Nachweis, dass mit Hilfe von Assays die Chemoresponse vorhergesagt werden kann. 1993 wurde in klinischen Untersuchungen der Beweis erbracht, dass die Ergebnisse des Assays signifikant mit der Überlebensrate der Tumorpatienten korrelieren (Fruehauf & Alberts, 2003). Zum Testen der Chemosensitivität bzw. Chemoresistenz wurden verschiedene *In-vitro*-Tests entwickelt, wobei man zwei Gruppen von Testverfahren unterscheiden kann: klonogene Assays und nicht-klonogene Assays (Dietz et al., 2010). Bei den klonogenen Tests findet zunächst eine Vermehrung der Tumorzellen statt, bevor die Behandlung mit dem Zytostatikum erfolgt; bei den nicht-klonogenen Tests fehlt diese.

1.6.2 MTT-Test

Zu den Zellvariabilitätstests zählt der häufig angewandte MTT-Test (*methylthiazol diphenyl tetrazolium bromide dye conversion assay*), der erstmals 1953 für die Chemosensitivitätstestung angewandt wurde (Black & Speer, 1953). Die frühere Lehrmeinung unterstellte, dass diese Technik nicht anwendbar ist für klinische Belange (Twentyman et al., 1989). Neuere Untersuchungen bestätigten, dass der MTT-Test einfach, schnell, wiederholbar im Verlauf der Erkrankung und relativ kostengünstig ist (Sargent, 2003). Die Erfolgsrate ist hoch mit Ergebnissen um 80% der Fälle und er liefert somit eine gute Korrelation mit dem klinischen posttherapeutischen Verlauf (Taylor et al., 2001). Ein Nachteil des MTT-Tests besteht darin, dass die Anzahl der auf das Chemotherapeutikum ansprechenden Zellen zu hoch bewertet wird, da die ruhenden Zellen in der G0/G1 Phase miterfasst werden (Sargent, 2003). Eine sensitivere Technik stellt z.B. der ATP-Test dar.

1.6.3 ATP-Test

Der ATP-Test wurde bereits 1984 entwickelt und misst den Endpunkt des Zellmetabolismus. Er ist vorzuziehen bei kleinen Proben wie z.B. bei Saug-/ Nadelbiopsien oder Plattenepithelkarzinomen. Heute ist der ATP-TCA (Tumor-Chemosensitivitäts-Asay) kommerziell als fertiger Test verfügbar. Nach Inkubation des Tumorgewebes für ungefähr 7 Tage erfolgt die Messung des durch Zelllyse freigesetzten ATPs luminometrisch. Die umfangreichste Erfahrung mit diesem Test wurde an Zellen von Ovarialkarzinomen und Mammakarzinomen gewonnen (Untch et al., 2003).

1.6.4 Si-Sensor Chips

Dieses Testverfahren spürt Veränderung im Zellmetabolismus auf. Generell kommen hier Biosensoren zur Anwendung, die aus zwei Komponenten bestehen; einer biologischen und einer physikalischen. In der Tat können Biosensoren als Chemosensoren gelten, da die Art der Signale chemischen Charakter hat. Grundsätzlich werden zwei Prinzipien von Sensoren unterschieden: (a) LAPS (*light-addressed potentiometric sensor*) (b) MSA (*multisensor array*) (Mestres-Ventura, 2003). Der LAPS vermag nur eine Veränderung zu messen, der MSA registriert online mehrere Parameter z.B. Impedanz, pH, O₂ und Temperatur.

1.6.5 Flavino-Assay

Flavine sind essentielle Komponenten der Flavoproteine. Flavin ist ein obligatorischer Bestandteil von Zellkulturmedien, vor allem das Riboflavin (B₂). Bei der allgemein praktizierten Zellkultur kommt es unvermeidlich zu einer Lichtexposition im Gegensatz zur *In-vivo*-

Situation. Es erfolgt dabei eine gravierende Photoreaktivität getriggert von sichtbarem Licht mit Wellenlängen unter 500 nm im Sinne eines Chaotropismus u.a. mit Generierung von zytotoxischen Sauerstoffradikalen (Dollner R., 1999). Viele Studien konnten beweisen, dass riboflavininduzierte Photoreaktionen auch ohne Einwirkung von Zytostatika zu einer Schädigung oder sogar zum Tod der Zellen führen (Granzow et al., 1995). Die große Varianz bei den Ergebnissen in Chemoresponsetests ist in dieser flavinvermittelten Photodegeneration begründet und kann durch deren Unterdrückung verhindert werden (Granzow et al., 1998). Dieses Phänomen wurde erstmals in Ehrlich-Aszites-Tumorzell-Kulturen entdeckt (Warburg et al., 1968). Vor diesem Hintergrund wurde der FLAVINO-Assay (*short-time ex vivo colony-forming assay-flavin protecting conditions*) entwickelt. Die photochemischen Artefakte werden bei dieser Methode vermieden durch Verwendung eines Zellkulturmediums ohne Phenolrot und einem reduzierten Gehalt an Riboflavin wie auch die Verwendung von ausschließlich monochromatischem Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 589 \text{ nm}$.

1.6.6 Kritische Beurteilung und Anforderungen an einen Assay

Die ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) kam nach gründlichen Literaturrecherchen zu dem Ergebnis, dass es bis jetzt kein Assay gibt, der nachweislich voraussagt, ob eine Chemotherapie in der onkologischen Praxis anspricht oder nicht (Schrug et al., 2004). Laut dieser Studie sollte ein erfolgreicher Assay einen hohen Gewinn und interpretierbare Ergebnisse für die Mehrzahl der Patienten liefern, deren Tumorgewebe untersucht wurde. Außerdem sollten die Ergebnisse innerhalb eines engen Zeitraums verfügbar sein, um eine Auswahl der besten Therapieregime gegenüber einer Standardtherapie zu treffen. Daneben sollten die Schwellenwerte zur Differenzierung zwischen Ansprechen und Resistenz widerspruchsfrei und leicht zu erkennen sein. In dieser Studie unterblieb die Testung von Kopf-Hals-Tumoren. Um die klinische Problematik noch besser darzustellen sollen die klinischen Ergebnisse bei 220 Mammakarzinomen und 284 Ovarialkarzinomen mit verschiedenen *In-vitro*-Tests auf eine Chemoresponse angeführt werden (Fruehauf & Alberts, 2003). Der negative prädiktive Wert [NPW] gibt an, mit welcher Sicherheit das Versagen korrekt prognostiziert wird. Der positive prädiktive Wert [PPW] hingegen, mit welcher Sicherheit der Therapieerfolg korrekt vorhergesagt wird. In der obengenannten Studie war der NPW generell deutlich höher und legt die Vermutung nahe, dass die Testung besser dazu dient, eine Ineffektivität einer Substanz herauszufiltern. Dies ist ein generell seit Jahren bekanntes Axiom und basiert auf der klaren Unterscheidung zwischen *In-vitro*-Modell und *In-vivo*-Pharmakodynamik. Des geringen Nachweises einer Effektivität der jeweiligen Testsubstanz wegen konnte bisher im klinischen Einsatz das Überleben der Patienten nicht signifikant gesteigert werden (Fruehauf &

Alberts, 2003). Neuere Ergebnisse mit Testung der Chemosensibilität ergaben signifikant später auftretende Rezidive bei sensiblen Tumoren (Michalski et al., 2008), (Neubauer et al., 2008). Bei der Vielzahl der beschriebenen Chemoresponsetests fehlte bislang ein für Kopf-Hals-Tumoren im klinischen Alltag anwendbarer Test (Dietz et al., 2010). Für Kopf-Hals-Tumoren sind folgende Assays zur Chemoresponsetestung geeignet: HDRA (*histoculture drug response assay*), HTCA (*human tumor cloning assay*), CCS (*capillary cloning assay*) und FLAVINO (Singh et al., 2002). Der letztgenannte FLAVINO-Assay ergibt durch seine Fähigkeit, die Flavin-induzierte Photodegeneration zu vermindern, besser reproduzierbare Ergebnisse. Die Schwierigkeit, von dem Ergebnis eines *In-vitro*-Tests auf die klinische Response zu schließen, besteht im Fehlen der extrazellulären Matrix, der Blutgefäße, der Nerven und der löslichen Substanzen von Tumor und Leukozyten (Miyamoto et al., 2004). Die bisher für die Chemosensibilitätstestung gebräuchlichen Assays wie MTT-Assay und ATP-Assay auf der Basis einer extremen Sensibilitätsresistenz erfassen nur ein Summensignal und vernachlässigen das Problem, dass der Tumor auch aus einer großen Zahl an normalen Zellen besteht, welche das Ergebnis verfälschen (Cree, 2009). Untersuchungen von Horn und Wichmann an 15 HNSCC unter Verwendung des Verfahrens der *Ex-vivo*-Chemoresponsetestung kamen zu dem Ergebniss, dass die Analyse von im Tumor enthaltenen Epithelzellen und Stromazellen separat durchgeführt werden muss, um valide und auch vergleichbare Ergebnisse zu bekommen (2010).

1.7 Integrin-Antagonisten und Radiotherapie

Die Radiotherapie stellt nach wie vor eine wichtige nichtchirurgische Option zur Behandlung von Karzinomen dar. Ziele der ionisierenden Strahlung sind unter anderem die Gefäßversorgung des Tumors, genauer die Gefäßendothelzellen selbst (Garcia-Barros et al., 2003). Bestrahlung führt zwar zu einer Zerstörung der Gefäßversorgung des Tumors, kann aber auch proangiogenetische Effekte hervorrufen. Albert et al. (2006) fanden heraus, dass bei einer Einzeldosis von 5 Gy eine Freisetzung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ in allen Zelllinien zu finden ist. Ebenfalls fand bei Kombination der Bestrahlung mit Cilengitide eine Loslösung von Zell-Zell-Kontakten statt, gefolgt von einem Anstieg der Apoptoserate. Eine Studie von Abdollahi et al. (2005) hatte die Wechselwirkungen vom Integrin-Antagonisten (S247) und hochenergetischer Photonenstrahlung zum Gegenstand. Hierbei konnte herausgefunden werden, dass Bestrahlung (2-15 Gy) grundsätzlich nicht nur zu einer höheren Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen in menschlichen Endothelzellen führt, sondern auch *Akt* phosphoryliert wird. *Akt*, auch Proteinkinase B genannt, spielt eine Rolle als antiapoptotische Proteinkinase und wird via Bestrahlung über den Phosphatidylinositol-3-Kinaseweg aktiviert. Infolgedessen wird ein

Mechanismus aktiviert, der es dem Tumor ermöglicht, sich vor Strahlenschäden zu schützen, indem der Integrinsignalweg erhalten bleibt. Bezüglich des Integrin-Antagonisten S247 konnte somit gezeigt werden, dass in Kombination mit Bestrahlung die antiangiogenetische Wirkung *in vitro* gesteigert werden und die *Akt*-Phosphorylierung verhindert werden konnte. Die Zahl an apoptotischen Endothelzellen stieg und man konnte konstatieren, dass Integrin-Antagonisten potente Radiosensitizer sind. *In vivo* wurde an Epidermoidzellen und Prostatakrebszellen gezeigt, dass die Kombination von Bestrahlung (5x2,5 Gy) und Chemotherapie mit Integrinantagonisten im Vergleich zur Monotherapie zu einer Erhöhung des antiangiogenetischen und antitumorösen Effektes führt. Ein wichtiges Fazit der Studie war ebenfalls, dass Integrinantagonisten selektiv einen durch Bestrahlung geförderten proapoptotischen Effekt auf aktivierte Endothelzellen ausübt, Integrinantagonisten aber nicht gleichermaßen auf die Gesamtheit aller teilenden Zellen wirken (Kettembeil, 2009). Experimentelle Brustkrebsstudien von Burke et al. an Mäusen konnten beweisen, dass die Anwendung von Cilengitide zu einer gesteigerten Wirksamkeit (bis zu 50%) einer Radioimmuntherapie mit einem Yttrium-90-konjugierten Tumorantikörper führt (2002), dies jedoch ohne unerwünscht erhöhte Toxizität erreicht wird. Cilengitide allein konnte das Tumorstadium jedoch nicht verändern.

1.8 Fragestellungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden folgende Fragestellungen untersucht:

- 1.) Gibt es bestimmte Eigenschaften wie AJCC-Stadium, Genussmittelanamnese, histologisches Grading und Tumorlokalisation, die mit einem besseren Anwachsen von HNSCC vergesellschaftet sind?
- 2.) Spielen extrazelluläre Matrixproteine (Fibronectin, Laminin, Kollagen Typ I, EZM-Gemisch) eine bedeutende Rolle für Koloniebildung *in vitro*?
- 3.) Welche Beschichtung ist die optimale für die jeweilige Risikokonstellation und Tumorlokalisation?
- 4.) Führt die Kombination von Cisplatin oder Docetaxel mit Cilengitide und / oder Cetuximab zu einer Steigerung der antitumoralen Wirkung bei primären HNSCC *ex vivo*?
- 5.) Gibt es Wechselwirkungen zwischen den Chemotherapeutika Cilengitide, Cetuximab, Docetaxel und Cisplatin in unterschiedlicher Dosierung bezüglich Koloniebildung beeinflussender Effekte, und sind diese in binären, tertiären und quartären Systemen differenzierbar?
- 6.) Welche der untersuchten Kombinationen lässt den größten therapeutischen Nutzen mit den Chemotherapeutika Cetuximab, Cisplatin, Docetaxel und Cilengitide bei HNSCC erwarten?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Die Untersuchungen erfolgten an Tumorproben von Plattenepithelkarzinomen wie von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig genehmigt. Die Patienten wurden vor dem operativen Eingriff und der Probebiopsie über die vorgesehenen Gewebsuntersuchungen schriftlich aufgeklärt und erteilten per Unterschrift ihr Einverständnis zur Weiterverwendung des Tumorgewebes für wissenschaftliche Untersuchungen. Ausschlusskriterien waren bei gegebener Narkosefähigkeit eine zu geringe Tumormasse. In die Auswertung wurden nur histologisch gesicherte Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCC) einbezogen.

In die Studie wurden insgesamt 92 Patienten aufgenommen, 11 Frauen (12,0%) und 81 Männer (88,0%). Zum Zeitpunkt der Probeentnahme lag das Alter der Patienten im arithmetischen Mittel bei 61 Lebensjahren (Median: 59 Lebensjahre). Die Altersrange reichte von 40 bis 83 Jahren (Tab.2).

Tab.2 Alter der Patienten bei Probeentnahme

Alter [Jahre]	Männer (n=81)	Frauen (n=11)	Gesamt (n=92)
Median	59.00	59.00	59.00
Minimum	40.00	46.00	40.00
25. Perzentil	52.00	50.00	52.00
75. Perzentil	70.50	70.00	70.00
Maximum	83.00	78.00	83.00
Mittelwert	60.99	61.00	60.99
Standardabweichung	10.814	10.945	10.769

Von jedem Patienten wurden Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation (ICD-Schlüssel), TNM-Klassifikation mit Grading, Stadieneinteilung nach AJCC-Kriterien, Risikofaktoren (Nikotin und Alkohol) und die Masse der verfügbaren Tumorbiopsie ermittelt.

Tab.3 Übersicht der 92 Patienten mit Angabe der Patienten-Identifikationsnummer [Pat.-ID], des Alters, des Geschlechts, der TNM-Klassifikation, der Tumorstadieneinteilung nach AJCC-Kriterien (Robbins et al., 2008) sowie der Anzahl der angesetzten Mikrotiterplatten

Pat.-ID	Alter [Jahre]	Geschlecht [0=♂; 1=♀]	Tumor-lokalisation [ICD-10]	TNM-Klassifikation	Stadium [AJCC]	Grading	Anzahl Mikrotiterplatten
1	57	0	C05.1	T2 N1 M0	III	G3	5
2	69	0	C32.1	T2 N0 M0	II	G2	3
3	67	1	C02.8	T3 N0 M0	III	G2	4
4	58	0	C13.0	T2 N2c M0	IVA	G2	5
5	78	1	C05.1	T2 N0 M0	II	G3	3
6	60	0	C09.9	T2 N2c M0	IVA	G3	5
7	58	0	C10.8	T4 N2c M0	IVA	G3	3
8	77	0	C13.8	T3 N1 M0	III	G2	3
9	69	0	C32.1	T3 N0 M0	III	G2	3
10	48	0	C01	T2 N0 M0	II	G2	4
11	43	0	C13.8	T2 N2a M0	IVA	G2	4
12	52	0	C10.8	T4 N2c M0	IVA	G3	5
13	63	0	C01	T0 N2c M1	IVC	G3	3
14	63	0	C09.8	T1 N2b M0	IVA	G3	3
15	57	0	C04.1	T2 N0 M0	II	G2	5
16	40	0	C10.8	T4a N2c M0	IVA	G2	3
17	71	0	C10.8	T4a N2b M0	IVA	G3	5
18	73	0	C 13.8	T4a N1 M0	IVA	-	5
19	66	0	C44.21	T2 N0 M0	II	G2	3
20	59	1	C10.8	T2 N2c M0	IVA	G3	4
21	50	0	C78.3	T3 N0 M0	III	G3	4
22	58	0	C13.8	T4a N2c M1	IVC	G2	4
23	78	0	C32.1	T2 N2b M0	IVA	G3	3
24	76	0	C32.1	T3 N2c M0	IVA	G3	4
25	55	0	C13.8	T1 N0 M0	I	G2	3
26	60	0	C02.1	T4 N0 M0	IVA	G2	4
27	52	0	C10.8	T4a N2a M0	IVA	G3	5
28	50	1	C31.0	T4a N0 M0	IVA	G3	4
29	78	0	C04	T2 N0 M0	II	G3	5
30	65	0	C32.1	T2 N2b M0	IVA	G3	3
31	57	0	C13.8	T4a N0 M0	IVA	G3	5
32	53	0	C10.8	T3 N3 M0	IVB	G2	5
33	59	0	C32.1	T2 N3 M0	IVB	G3	3
34	51	0	C01.0	T4b N3 M0	IVB	G2	5
35	69	0	C32.0	T1 N0 M0	I	G2	5

36	49	0	C10.8	T4b N2b M0	IVB	G2	1
37	52	0	C02.1	T4a N2a M0	IVA	G2	5
38	70	0	C13.8	T3 N1 M0	III	G2	1
39	51	0	C01	T3 N2c M0	IVA	G3	5
40	49	0	C13.8	T4a N2c M1	IVC	G3	3
41	77	0	C10.8	T4a N2c M0	IVA	G2	5
42	49	0	C01	T4a N2b M0	IVA	G2	5
43	67	1	C06.8	T4a N2c M0	IVA	G2	1
44	77	0	C13.8	T3 N2b M0	IVA	G3	5
45	40	0	C32.1	T4a N2c M0	IVA	G2	3
46	52	0	C04.0	T2 N2b M0	IVA	G2	1
47	43	0	C13.8	T2 N2c M0	IVA	G2	3
48	82	0	C32.0	T1a N0 M0	I	G2	5
49	56	0	C09.8	T4a N2b M0	IVA	G3	3
50	75	1	C09.8	T1 N0 M0	I	G2	3
51	61	0	C10.8	T1 N2c M0	IVA	G3	5
52	50	1	C32.1	T3 N2c M0	IVA	G2	4
53	82	0	C32.8	T4a N2c M1	IVC	G3	3
54	59	0	C13.8	T4a N0 M0	IVA	G3	5
55	56	0	C09.8	T2 N2a M0	IVA	G2	4
56	53	1	C10.9	T4b N3 M0	IVB	G2	4
57	58	0	C10.8	T3 N2c M0	IVA	G2	5
58	74	0	C09.9	T3 N2b M0	IVA	G2	3
59	61	0	C13.8	T4a N3 M0	IVB	G3	3
60	64	0	C32.8	T4a N0 M0	IVA	G2	5
61	61	0	C13.8	T3 N2b M0	IVA	G3	5
62	76	0	C32.8	T4a N0 M0	IVA	G2	5
63	60	0	C10.8	T4a N2b M0	IVA	G3	3
64	57	0	C13.8	T2 N3 M0	IVB	G2	5
65	70	1	C02.1	T1 N1 M0	III	G2	3
66	76	0	C30.0	-	-	-	5
67	56	0	C09.8	T4a N2c M0	IVA	G2	5
68	64	0	C01	T4a N0 M0	IVA	G3	3
69	73	0	C13.8	T2 N0 M0	II	G3	4
70	53	0	C01	T4 N2c M0	IVA	G3	5
71	57	0	C32.1	T3 N2c M0	IVA	G3	5
72	73	0	C30.0	-	-	G2	3
73	75	0	C09.9	T2 N2b M0	IVA	G2	5
74	70	0	C02.8	T4a N2c M0	IVA	G2	5
75	47	0	C06.0	T4a N0 M0	IVA	G3	4

76	51	0	C09.8	T1 N2b M0	IVA	G3	3
77	52	0	C32.1	T2 N0 M0	II	G2	4
78	56	0	C10.8	T4b N2b M0	IVB	G2	3
79	46	1	C02.8	T3 N2c M0	IVA	G2	3
80	56	0	C09.8	T2 N0 M0	II	G2	5
81	44	0	C32.1	T3 N2b M0	IVA	G3	5
82	55	0	C02.8	T2 N0 M1	IVC	G3	5
83	76	0	C32.1	T4a N2a M0	IVA	G2	1
84	71	0	C32.1	T4b N2c M0	IVB	G3	5
85	71	0	C13.8	T2 N0 M0	II	G2	3
86	56	0	C10.8	T3a N2b M0	IVA	G2	1
87	50	0	C13.8	T4a N2b M0	IVA	G3	5
88	83	0	C10.8	T3 N2b M0	IVA	G1	3
89	56	1	C02.1	T1 N1 M0	III	G3	5
90	65	0	C09.8	T4a N0 M0	IVA	G2	4
91	61	0	C09.8	T1 N3 M0	IVB	G3	4
92	48	0	C09.8	T3 N2b M0	IVA	G2	5

Insgesamt wurden 92 Patienten eingeschlossen. Davon hatten 18 (19,6%) Hypopharynx-Karzinome, 19 (20,7%) Larynx-Karzinome, 29 (31,5%) Oropharynx-Karzinome und 22 (23,9%) Karzinome der Mundhöhle als primäre Tumorlokalisation. Unter Divers (n=4) wurden die folgenden Karzinome gezählt: Karzinom der Kieferhöhle (n=3) und ein Plattenepithelkarzinom der Ohrmuschel (n=1).

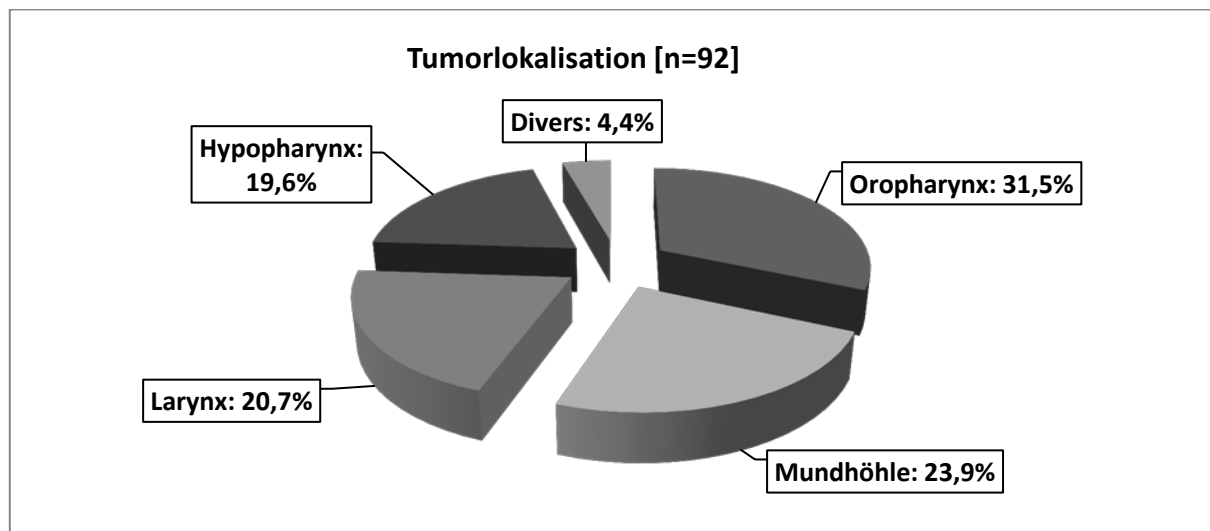


Abb.1 Verteilung der Tumorpapienten nach Lokalisation des Primarius (n=92)

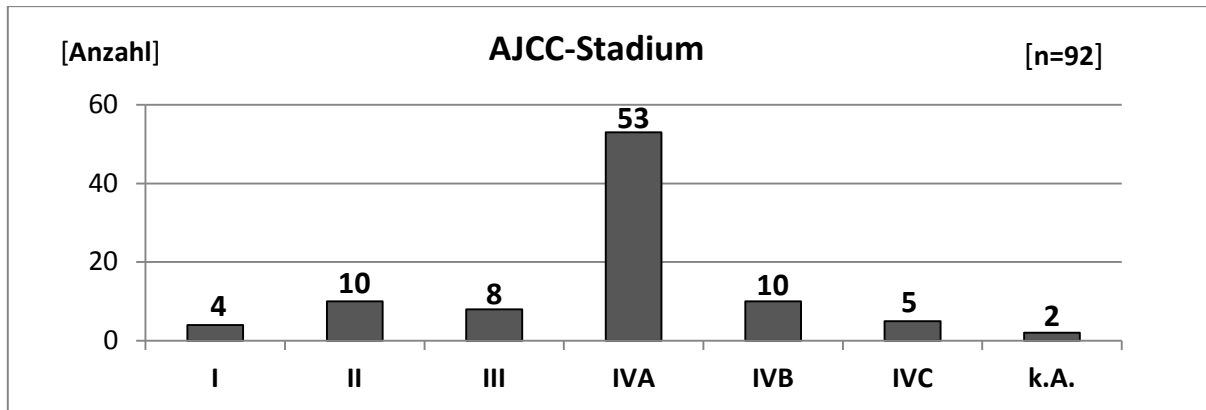


Abb.2 Tumorstadieneinteilung nach AJCC der 92 Patienten

Fast drei Viertel der Karzinome (n=68; 74%) wurden als Stadium IV nach AJCC kategorisiert. 11% (n=10) der Karzinome befanden sich im Stadium II und 9% (n=8) der Karzinome im Stadium III. Nur 4% (n=4) waren dem Stadium I zuzuordnen. Bei 2 Patienten konnte keine Aussage bezüglich des AJCC-Stadiums getroffen werden (Abb.2).

2.2 Material

Zur Durchführung der Chemoresponsetestung fanden die nachstehend aufgeführten Materialien Verwendung (Liste 1-6).

2.2.1 Reagenzien

In Liste 1 sind die im Zusammenhang der Arbeit genutzten Reagenzien zu finden.

Liste 1 Reagenzien

Produktname	Hersteller
<i>Aqua ad injectabilia</i>	DeltaSelect, Pfullingen
Collagenase Typ IV E3.4.24.3 (300U/mg)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Flavinfreies Medium RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin
Amikacin (Stock 5 mg/ml)	Fresenius, Bad Homburg
Casyton ® Lösung	Schärfe System, Reutlingen
Casy Clean	Innovatis, Indianapolis
Ethanol absolut <i>p.a.</i>	Apotheke, Universitätsklinik
Fötales Rinderserum (FKS) (Origin South America)	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamicin	Hexal, Holzkirchen
Glyzerol	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin

Methanol <i>p.a.</i>	J.T. Baker, Deventer, Holland
Nystatin Suspension	Sigam-Aldrich, Steinheim
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Dulbecco)	Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES 1M	GIBCO, Carlsbad (USA)
TMB Substrate Reagent Set	Becton & Dickinson Bioscience, NJ, USA
TMB 1-Step Ultra	Pierce

2.2.2 Zytostatika

In Liste 2 sind die Hersteller und Lieferanten der getesteten Chemotherapeutika aufgeführt.

Liste 2 Zytostatika

Zytostatika	Hersteller
Cisplatin Infusionslösung (cis-DDP) (1mg/ml)	Gry-Pharma, Kirchzarten
Cisplatin Trockensubstanz (cis-DDP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cilengitide	Merck Serono, Darmstadt
Cetuximab (C225)	Merck Serono, Darmstadt
Docetaxel (Taxotere)	Sanofi-Aventis, Antony Cedex, Frankreich

2.2.3 Antikörper

In Liste 3 sind die für die Bestimmung epithelialer Zellen eingesetzten Antikörper zu finden.

Liste 3 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Pan-Cytokeratin (SC-8018, C11)	Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, USA
Cy2 TM -conjugated affini, pure goat anti-mouse IgG	Jackson Immuno Research, Suffolk, GB

2.2.4 Geräte und Software

In Liste 4 sind die für die Experimente erforderlichen Geräte und Softwareartikel aufgeführt.

Liste 4 Geräte und Software

Produkt	Hersteller
AccuJet Pipettierhilfe	Brand, Wertheim
Achtkanalpipette	VWR, Dresden

Membran Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Freiburg
Brutschrank Hera Cell 150	Heraeus, Hanau
Multizentrifuge 1L	Heraeus, Hanau
Inverses Forschungsmikroskop Zeiss Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Präzisionswaage	Mettler AJ150
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Wasserbad WB 10	Medingen, Dresden
Digitale Farbkamera Micropublisher	Q-Imaging, Burnaby, Kanada
Inverses Mikroskop Olympus IX70	Olympus, Hamburg
Schüttler Grant bio PMR 30 Sc	Grant Instruments, Cambridgeshire, GB
SOX-E Natriumdampf Lampe	Philips, Hamburg
Casystat [®]	Schärfe System, Reutlingen
Microsoft Exel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SPSS Statistics 21.0	SPSS Inc., Chicago, USA
Volocity Imaging Software	Improvision, Tübingen
Bestrahlungsgerät mit Röntgenröhre: Darpac 150-MC	Ray Technologies, Wiltshire, GB
Vortex MS1 Minishake	Ika-Werke Staufen, Deutschland

2.2.5 Einmalartikel

In Liste 5 sind die für die Experimente benötigten Einmalartikel aufgeführt.

Liste 5 Einmalartikel

Artikel	Hersteller
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Einmalspitzen (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson, Fraga, Spanien
Einmalskalpell Größe 10	Braun, Tuttlingen
Eppendorf Safe-Lock Gefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Deep well storage Platten	Greiner, Frickenhausen

Zentrifugenröhrchen (50 ml, 10 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Mikrotiterplatten 96 Kavitäten mit flachem Boden und Deckel, steril	TPP, Tradsadingen, Schweiz
Mikrotiterplatten 96 Kavitäten (ECM-beschichtet)	Paesel & Lorei, Hanau
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg

2.2.6 Glaswaren

In Liste 6 sind die verwendeten Glaswaren aufgelistet.

Liste 6 Glaswaren

Artikel	Hersteller
Messbecher	Labor- und Messgeräte, Ilmenau
Steriplan Petrischale	Schott, Mainz
Weithalsflaschen aus Braunglas	Schott, Mainz
Uhrglasschale	Schott, Mainz

2.3 Zelllinie KB

Diese einschichtig wachsende Zelllinie entstammt einem Epidermoidkarzinom der Mundhöhle eines männlichen Kaukasiers (Hay et al., 1994). Im Laufe der Züchtung wurden diese mit HeLa-Zellen (ein Adenokarzinom der Zervix) alteriert (Gey et al., 1952). Beide Zellstämme enthalten Sequenzen des Humanen Papillomvirus Typ 18 (Boshard et al., 1984). Die zur Testung verwendeten KB-Zellen entstammen dem Labor von Prof. Granzow am DKFZ in Heidelberg, der sie dort seit 2000 in flavinarmem Medium RPMI 1640 ohne Phenolrot kultivierte. Diese Kulturführung wurde seit 2007 im HNO-Forschungslabor fortgesetzt und in der vorliegenden Arbeit zur Qualitätsprüfung verwendet.

2.4 Methoden

2.4.1 Flavingeschützte Bedingungen

Um eine Verfälschung der Testergebnisse durch eine flavinvermittelte Photoreaktion auszuschließen, wurde ein in Auftragssynthese durch Biochrom (Berlin) hergestelltes modifiziertes RPMI 1640 (flavinfrei und phenolrotfrei und für einen CO₂-Gehalt von 3,5% mit 13,5 mM NaHCO₃ und 14,5 mM HEPES gepuffert) als Zellkulturmedium eingesetzt. Die Experimente

wurden ausschließlich unter Beleuchtung von SOX-E-Natriumdampf lampen (Philips, Hamburg) mit monochromatischem Licht der Wellenlänge $\lambda = 589 \text{ nm}$ durchgeführt.

2.4.2 Herstellung der Stammlösungen

Die Herstellung der Stammlösungen erfolgte unter flavinfreien Bedingungen aus den vorher genannten Originalmaterialien (siehe 2.2). Die Lösungen wurden steril filtriert, exakt bemessen und in lichtgeschützten Eppendorfgefäßen bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Bereits aufgetaute und nicht vollständig verbrauchte Reagenzien wurden entsorgt.

2.4.3 Stammlösungen der einzelnen Chemotherapeutika

2.4.3.1 *Cetuximab*

Cetuximab wurde als pharmazeutische Präparation (5 mg/ml) von Merck Serono (Darmstadt) zur Verfügung gestellt und wurde in einer Konzentration von $66,6 \text{ } \mu\text{g/ml}$ in den Experimenten eingesetzt. Dies entspricht einer Konzentration, die bei Zelldichten kleiner $10^5/\text{ml}$ (oder Tumormasse kleiner 10 mg/ml) allgemein zu einer Sättigung der EGFR-Epitope bei von HNSCC stammenden Zellen führt.

2.4.3.2 *Cilengitide*

Cilengitide (EMD121974) wurde als Lösung von 500 mg in 33,3 ml von Merck Serono (Darmstadt) zur Verfügung gestellt. Cilengitide ist als sehr gut wasserlösliches zyklisches Pentapeptid auch in sehr hohen Konzentrationen *in vitro* einsetzbar. Zunächst war deshalb die Frage einer geeigneten Dosierung *in vitro* im Verhältnis zu innerhalb von Therapien *in vivo* realisierbaren Konzentrationsbereichen zu beantworten. Entsprechend der Publikation von Nabors et al. (2007) über maximale Cilengitidekonzentrationen (AUC, *Area under the Curve*) im Plasma mit Cilengitide therapierten Glioblastom-Patienten wurde von Herrn Dr. Wichmann über lineare Regression eine geeignete Konzentration bestimmt, die dem Design der ADVANTAGE-Studie mit HNSCC entsprechend bei Übertragung der an Gliomen erhobenen Abhängigkeiten der *In-vivo*-Konzentration im Plasma von der dort eingesetzten Dosis folgt. Dabei wurde eine Konzentration von $10,00 \text{ } \mu\text{M}$ *ex vivo* als geeignet ermittelt. Dementsprechend wurden einheitlich in allen Experimenten Endkonzentrationen von $10 \text{ } \mu\text{M}$ Cilengitide eingesetzt.

2.4.3.3 *Cisplatin (cis-DDP)*

Die cis-DDP-Trockensubstanz wurde unter flavinfreien Bedingungen in *Aqua ad injectabilia* gelöst (Stammlösung $6,667 \text{ } \mu\text{M}$) und für alle Versuche mit Cisplatin verwendet.

2.4.3.4 Docetaxel (DTX)

Die DTX-Stammlösungen (100 μ M bzw. 1,237 mM) wurden durch Verdünnung der Polysorbat 80-haltigen Konzentratlösung mit 30%igem Ethanol hergestellt.

2.4.4 Zellkulturmedium

2.4.4.1 Flavinfreies Medium RPMI 1640

Das flavinfreie Medium RPMI 1640 wurde mit 1% (v/v) 200 mM L-Glutamin und 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) versetzt, steril filtriert und sofort zur Anwendung gebracht.

2.4.4.2 Tumormedium [TM]

Der Transport der Tumorbiopsien erfolgte in einem sogenannten Tumormedium, das später auch bei den Tests als Aufbewahrungsmedium diente. Dem flavinarmen und phenolfreien mit Glutamin und FKS versetzten Medium RPMI 1640 wurden antimikrobielle (100 IE Penicillin-G-Natrium, 100 μ g Streptomycinsulfat, 100 μ g Amikacin) und antimykotische Substanzen (233 IE/ml Nystatin) zugesetzt, um Verfälschungen durch mikrobielle Verunreinigungen zu vermeiden. Darüber hinaus beinhaltet dieses Medium 14,5 mM HEPES und 13,5 mM NaHCO_3 und nach Supplementierung mit 10% FKS ca. 20 nmol/l Flavin.

2.4.4.3 Verdaumedium

Die manuell mittels Skalpells zerkleinerte Tumormasse wurde einem enzymatischen Verdau mittels 120 mU/ml Kollagenase Typ IV von *Clostridium histolyticum* (Sigma, Deisenhofen) unterzogen, um die Zellen von der Basalmembran zu dissoziieren. Hierbei ist von Bedeutung, dass in dem Tumorgewebe andere interzelluläre Kontakte bestehen bleiben und somit eine Zelltrennung mit Verlust regulatorischer Signale allgemein vermieden wird. Die *in vivo* bedeutsame Zell-Zell-Kommunikation blieb somit auch *ex vivo* erhalten.

2.4.5 Verwendete Lösungen

2.4.5.1 Blocklösung

Die für die Auswertung der Experimente erforderliche Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit einer sog. Blocklösung bestehend aus PBS, 1% FKS und 0,05% Tween20.

2.4.5.2 Waschlösung

Als Waschlösung wurde PBS (pH 7,35) mit 0,05% Tween20 verwendet.

2.4.5.3 FKS (fötales Kälberserum)

Nach dem Auftauen der Flaschen mit FKS über Nacht (Lagerung bei -80 °C) wurden diese im Wasserbad bei 56 °C eine Stunde hitzeinaktiviert, um Komplement zu inaktivieren. Nach Zentrifugieren bei 4000 rpm für 20 Minuten wurde der Überstand in Röhrchen aliquotiert, bei -20 °C gelagert.

2.4.6 Antikörper zur Fluoreszenzfärbung

2.4.6.1 Pancytokeratin-AK

Zur Detektion von Cytokeratin wurde als primärer Antikörper der pan-Cytokeratin Antikörper C11 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA; sc-8018) verwendet. Dieser ist ein monoklonaler Mausantikörper der es gestattet, humane Epidermoidtumorzellen zu detektieren, da er Cytokeratin Typ 4, 5, 6, 8, 10, 13 und 18 bindet. Er wurde bei 4 °C aufbewahrt und zur Färbung 1:400 verdünnt in Blocklösung eingesetzt.

2.4.6.2 Cy2 AK conjugated AffiniPur Goat Anti-Mouse IgG

Als Sekundär-Antikörper wurden Cy2-konjugierte Ziege-Anti-Maus-Antikörper (*Cy2 conjugated AffiniPur Goat Anti-Mouse IgG* Jackson ImmunoResearch 115-225-003 über Dianova) eingesetzt. Zuvor wurde er in PBS mit 10% FKS und Glycerol im Dunkeln bei 4 °C geschüttelt und aliquotiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20 °C. Das in Blocklösung verdünnte Konjugat wurde in einer Konzentration von 1:400 verwendet.

2.5 *Ex-vivo* Chemoresponsetestung

2.5.1 Probengewinnung

Bei Vorliegen des schriftlichen Einverständnisses der informierten Patienten wurde während des chirurgischen Eingriffs in Vollnarkose eine Probe bioptisch entnommen. Danach gelangten die in Tumormedium bei Raumtemperatur inkubierten Tumorproben innerhalb max. einer Stunde in das HNO-Forschungslabor, wo sie sofort aufbereitet wurden.

2.5.2 Aufbereitung der Proben

Im Labor wurde das Feuchtgewicht der Tumormasse bestimmt und das Tumorgewebe mit Hilfe von Einmalskapells in einer Uhrglasschale zu einzelnen Fragmenten von ungefähr 0,1 mm³ bis 10 mm³ zerkleinert. Die entstandene Mousse wurde kurz aufgeschwemmt, in eine sterile Weithalsflasche aus Schott-Braunglas umgefüllt, mit vorgewärmtem und begastem Verdaumedium (30 ml TM mit 120 mU/ml *Clostridium histolyticum*-Kollagenase IV) in Sus-

pension gebracht und 16 Stunden im Brutschrank bei Standardbedingungen (36,5 °C, 3,5% CO₂, relative Luftfeuchtigkeit 95%) inkubiert. Nach enzymatischer Aufspaltung wurde der Verdau 10 min bei 1200 prm zentrifugiert, das Pellet gewaschen und in TM resuspendiert.

2.5.3 Chemoresponsetestung mit 96er Mikrotiterplatten

Da eines der wesentlichen Ziele der vorliegenden Studie die Beeinflussung der Adhärenz der Tumorzellen und Koloniebildung durch Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) war, wurde die Chemoresponse der HNSCC auf die verwendeten Chemotherapeutika (Cis und DTX) bei Anwesenheit von Cil oder/und Cetux im Vergleich zu Kontrollen ohne beide Therapeutika unter Verwendung unterschiedlich mit EZM beschichteter Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten bestimmt. Hierbei wurden für jeden Patienten fünf 96er-Platten mit unterschiedlichen Beschichtungen vorbereitet. Es wurden einerseits zwei ECM-Platten (Paesel+Lorei; Hanau, Deutschland) eingesetzt. Diese Platten sind patentiert bearbeitete Zellkulturplatten, in denen eine murine Fibroblasten-Zelllinie wuchs, durch Bestrahlung abgetötet und nachfolgend so entfernt wurde, dass EZM an der Polystyrenoberfläche der Platten verbleibt und eine nachgewiesenermaßen vorteilhafte Oberfläche bildet, an welcher der Großteil der bisher untersuchten Zelllinien das beste Wachstumsverhalten zeigt. Außerdem wurden drei Zellkulturplatten mit flachem Boden (TPP, Trasadingen) entweder mit humanem Laminin, humanem Fibronectin oder Kollagen Typ I (aus Rattenschwänzen) beschichtet. Die Proteine wurden dabei mit 2 µg/ml in PBS zur Beschichtung eingesetzt (50 µl pro Kavität). Nach Absaugen des Überstandes und Trocknung in der Sicherheitswerkbank wurden die Platten bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Alle Arbeitsschritte zur Testung der Tumoren wie auch der Zelllinie KB zur Qualitätskontrolle des Testverfahrens wurden entsprechend dem Protokoll des FLAVINO-Assays zur Vermeidung von photochemisch bedingten Artefakten unter flavinschützenden Bedingungen (Vermeidung von Wellenlänge unter $\lambda = 550$ nm) durchgeführt. Die zwei Zytostatika Cis und DTX wurden in drei Konzentrationen getestet, jeweils $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ und 1 der TPL (*tolerated plasma level*; 6,667 µM Cis bzw. 550 nM DTX). Diese Verdünnungen und diejenigen von Cetux und Cil wurden in jeweils sechsfacher Konzentration in TM vorbereitet, TM in die Kavitäten vorgelegt und dann die vier Präparate entsprechend dem Pipettierschema (Anhang 1) mit jeweils 50 µl in die Kavitäten der 96-er Mikrotiterplatten eingebracht. Die vorbereiteten Platten wurden im Brutschrank für mindestens 30 min inkubiert (Equilibrierung der Temperatur und Einstellung des pH-Wertes über die CO₂-haltige Atmosphäre), bevor jeweils 100 µl des Tumorverdaus (10 mg/ml) in jede Kavität pipettiert wurden. So ergab sich pro Well eine Gesamtmenge von 300 µl. Nach 72 Stunden Inkubation unter Standardbedingungen (siehe oben) im

Brutschrank wurde die Zellkultur beendet, Kulturüberstände abgenommen, bei -20 °C gelagert und für Zytokinmessungen eingesetzt. Die Kavitäten wurden mit PBS gewaschen, die adhären Zellen mit Ethanol in aufsteigender Reihe fixiert und nach Fluoreszenzfärbung zum Nachweis epithelialer Zellen durch Zählung ausgewertet (2.5.5.).

Zur Qualitätssicherung wurde die Zelllinie KB mit den für die Testung des Tumors genutzten Verdünnungen der Therapeutika getestet. Da KB sehr niedrige IC₅₀ für alle Therapeutika hat (Tab.4), wurde seriell verdünnt, um den Konzentrationsbereich des achtfachen des für das jeweilige Zytostatikum publizierten IC₅₀ für KB-Zellen und acht log₂-Stufen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu untersuchen.

Tab.4 IC₅₀ der verwendeten Chemotherapeutika

Zytostatikum	IC ₅₀ [µM]	Quelle
Cisplatin	2,54 ± 0,78	(Zhang et al., 2009)
Docetaxel	0,28	(Dollner et al., 2004)
Cilengitide	0,5 ± 0,1	(Burkhart et al., 2004)

2.5.4 Chemoresponse und Bestrahlung

Von 41 Tumorpatienten wurde eine der ECM-Platten unmittelbar nach Ansetzen der in 2.5.3. beschriebenen Chemoresponsetestung (d.h. ca. 30 min danach) mit einer Einzeldosis von 2,2 Gy bestrahlt. Die Dosisleistung betrug 0,86 Gy/Min. Es wurde das Gerät Darpac 150-MC der Firma Raytech verwendet.

2.5.5 Fixierung und Färbung

Nach ca. 72 Stunden Inkubation wurde jede Platte auf eine eventuelle mikrobielle Kontamination kontrolliert und ggf. verworfen. Die 96er Mikrotiterplatte wurde nach der Entnahme der Kulturüberstände jeweils zweimal pro Kavität mit 100 µl PBS (*phosphate buffered saline*, pH 7,35) gewaschen. Es war dabei zu beachten, dass die gewachsenen Kolonien nicht zerstört wurden; Detritus aber sollte möglichst beseitigt werden. Nach Überprüfung unter dem Lichtmikroskop wurden die Kolonien mit 100 µl/Well eiskaltem 40%igem Ethanol pro Kavität 10 min fixiert. Anschließend wurden die Platten auf Filterpapier trocken geklopft und mit 100 µl eiskaltem 90%igem Ethanol pro Kavität 15 min fixiert und nachfolgend die Platte an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wurde 100 µl/Well Blocklösung aufgetragen, die Platten 30 min auf dem Plattenschüttler inkubiert (200 rpm) und danach auf Filterpapier ausgeklopft. Zur Fluoreszenzfärbung wurden 50 µl/Well primärer Pancytokeratin-Antikörper-Pufferlösung 1 (C11; SantaCruz sc-8018) pipettiert und lichtgeschützt über Nacht bei 4 °C

inkubiert. Danach wurden die Platten jeweils zweimal mit Waschlösung (50 µl/Well) gereinigt und trocken geklopft. Das sekundäre Cy2TM-konjugierte Ziege-Anti-Maus-IgG (Jackson ImmunoResearch, Cambs, UK) wurde nach 1:400 Verdünnung in der Antikörper-Pufferlösung 2 (Antikörperstammlösung, Blocklösung, PBS) mit 50 µl/Well pipettiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte für ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (PBS mit 0,1% Tween20) wurde mit *Aqua bidest.* (100 µl/Well) gespült und luftgetrocknet.

2.5.6 Auswertung

Nach Lufttrocknung der 96er Mikrotiterplatten wurden die Kolonien im inversen Forschungsmikroskop Zeiss Axiovert 200M (Zeiss, Jena, Germany) mit dem Filterset 44 und 43 HE zuerst in den Kontrollkavitäten beurteilt und bei einer Epithelzellkolonieanzahl von ≤ 4 pro Kavität die ganze Platte verworfen. Bei einem Wert von ≥ 4 Epithelzellkolonien pro Kontrollkavität wurde die Konzentration des Zytostatikums als Richtwert genommen, bei der die Epithelzellkolonien gebildet worden waren. Ein gutes Koloniewachstum wurde mit Hilfe der Volocity Imaging Software beispielhaft dokumentiert (Abb.3). Für die Auswertung der Chemoresponsestestung wurden nur ≥ 4 Epithelzellkolonien pro Kontrollkavität berücksichtigt, die restlichen Platten wurden verworfen. Zur Differenzierung der Chemoresponse wurde für jede Zytostatikumkonzentration per Lichtmikroskop die Anzahl der gewachsenen Epithelzellkolonien pro Kavität ausgezählt und in einer Tabelle dokumentiert.

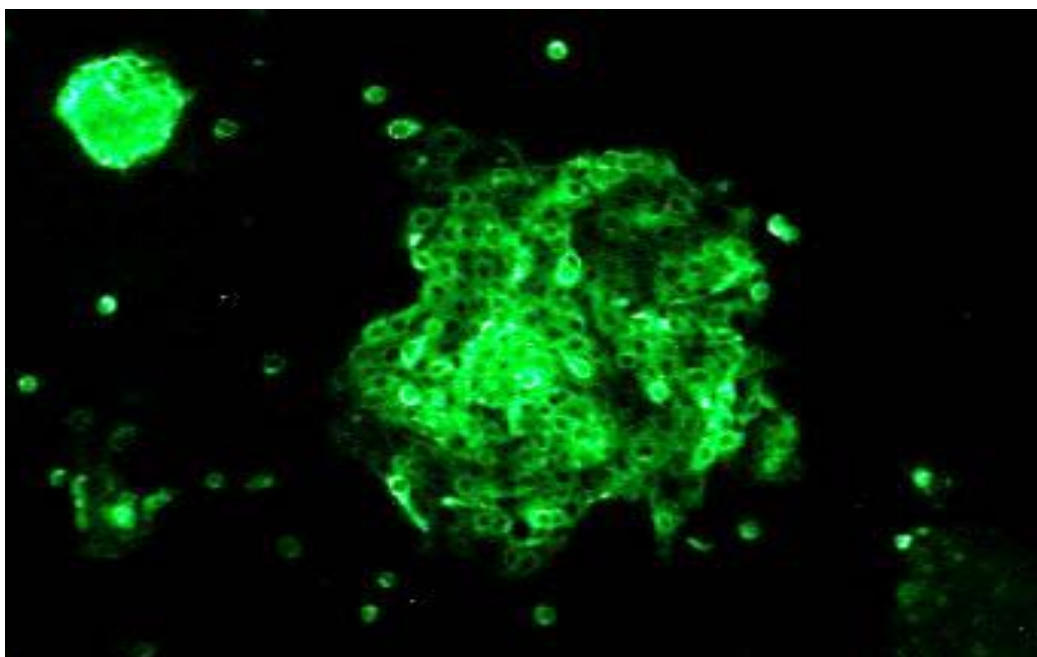


Abb.3 angewachsene Plattenepithelkolonie nach Fluoreszenzfärbung

3 Ergebnisse

3.1 Koloniebildungsverhalten im Kontrollmedium

In der vorliegenden Studie wurden 100 Tumorproben von 92 Patienten mit Hilfe des FLAVINO-Assays auf die Wirkung der Chemotherapeutika Cil, DTX, Cis und Cetux untersucht. Zunächst erfolgte die Prüfung, welche Abhängigkeit das Koloniewachstum im Kontrollmedium, d.h. ohne Chemotherapeutika, bei verschiedenen Faktoren hat und in welchen Fällen kein Koloniewachstum erzielt werden konnte.

3.1.1 Koloniebildungsverhalten differenziert nach Alter der Patienten bei der Tumorbiopsie

Im Mittel waren die Patienten mit Koloniewachstum (n=41) zum Zeitpunkt der Tumorbiopsie 2,51 Lebensjahre älter als ihre Vergleichsgruppe ohne Koloniewachstum (n=59). Die Lebensaltersdifferenz im Median betrug zwei Lebensjahre.

3.1.2 Koloniebildungsverhalten unterteilt nach AJCC-Stadium

Unterteilt nach AJCC-Stadien wurden differente Koloniebildungsraten festgestellt (Stadien I, II, III, IVA und IVB wiesen 50%, 60%, 30%, 39%, 20% auf), die einen abnehmenden Trend suggerieren. Abweichend verhalten sich HNSCC im fortgeschrittenen Stadium IVC; sie weisen wie das Stadium II eine Koloniebildungsrate von 60% auf. Ob diese höhere Koloniebildungsrate in einer differenten Biologie (Fernmetastasierung) begründet ist, bleibt aufgrund der geringen Fallzahl (n=5) fraglich (Abb.4).

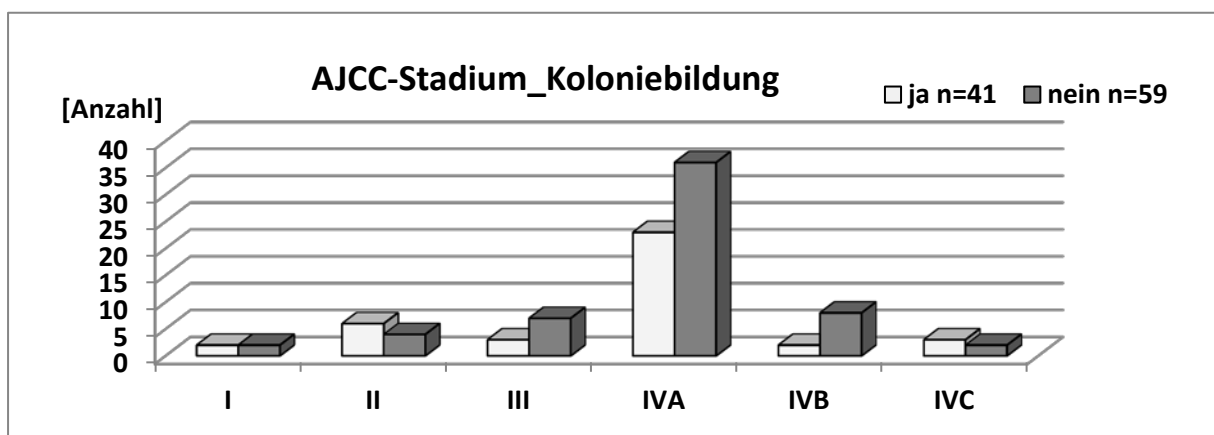


Abb.4 Abhängigkeit der Koloniebildung epithelialer Tumorzellen von dem AJCC-Stadium bei 100 Tumorproben

3.1.3 Koloniebildungsverhalten unterteilt nach dem Grading der Tumorproben

Die Differenzierung nach dem Tumorgrading ergibt, dass G2-Tumore in 43% der Fälle ein Koloniewachstum aufzeigen und G3-Tumore in 34% der Fälle (Abb.5).

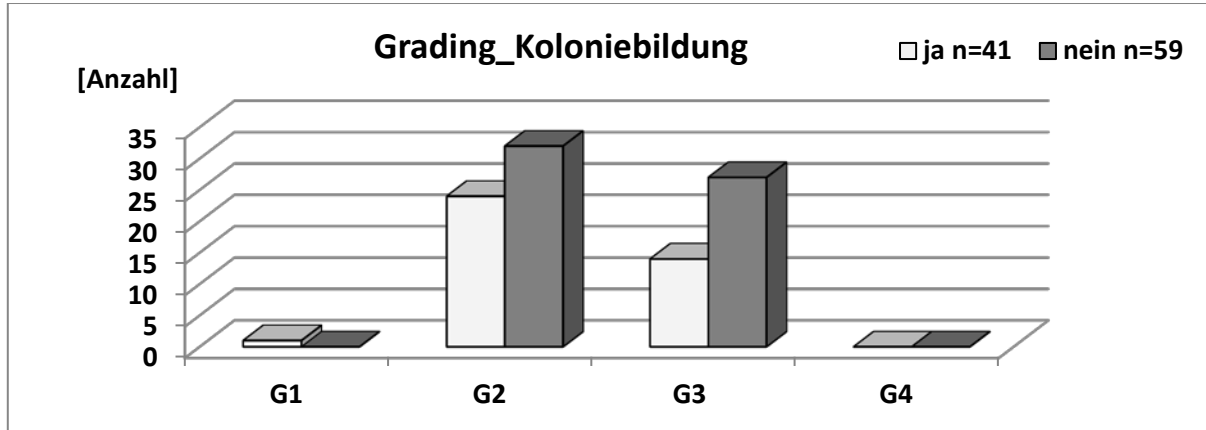


Abb.5 Abhängigkeit der Koloniebildung epithelialer Tumorzellen von dem Gradinggrad bei 100 Tumorproben

3.1.4 Koloniebildungsverhalten unterteilt nach Alkoholkonsum

In Bezug auf die Alkoholanamnese ist zu konstatieren, dass Tumorproben von Patienten, die keinen Alkohol konsumieren, höhere Koloniebildungsraten aufweisen (71%). Tumorproben von Patienten mit einem täglichen Alkoholkonsum von 30 g bis 60 g weisen eine Koloniebildungsrate von ca. 35% auf. Proben von Patienten mit einem täglichen Alkoholkonsum von mehr als 60 g Alkohol wachsen nur zu 31% an. Folglich sinkt mit der Höhe des Alkoholkonsums die Koloniebildungsrate (Abb.6).

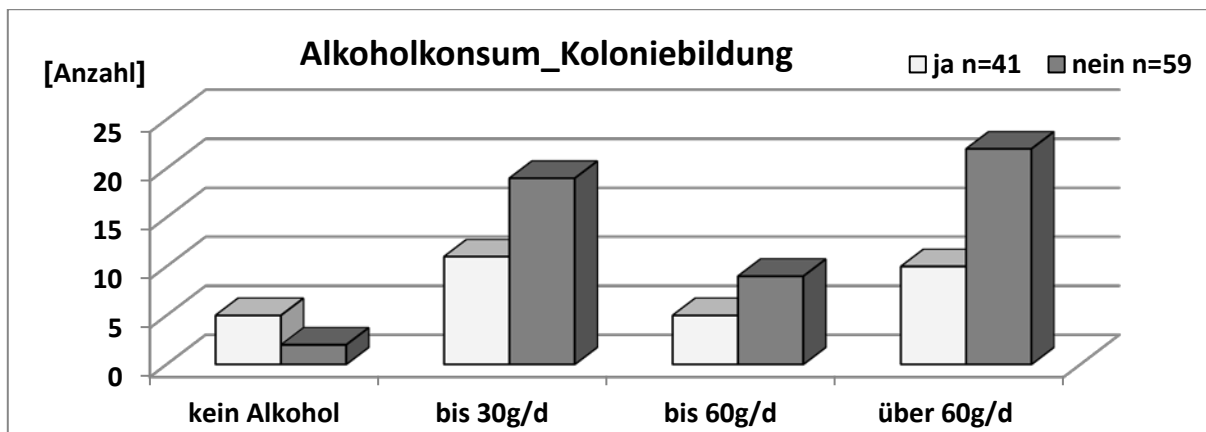


Abb.6 Abhängigkeit der Koloniebildung epithelialer Tumorzellen von dem Alkoholkonsum bei 100 Tumorproben

3.1.5 Koloniebildungsverhalten unterteilt nach Zigarettenkonsum

Bei den Nichtrauchern erreicht die Koloniebildungsrate 50% und liegt bei den Patienten mit bis zu 40 *pack year* [PY] mit 45% fast auf annähernd gleichem Niveau. Tumorproben von Patienten mit bis zu 20 PY wachsen schlechter an. Deren Koloniebildungsrate beträgt nur 21%. Patienten mit einem Zigarettenkonsum über 40 PY zeigen eine Koloniebildungsrate von 32%. Insgesamt ergibt sich kein einheitlicher Trend (Abb.7).

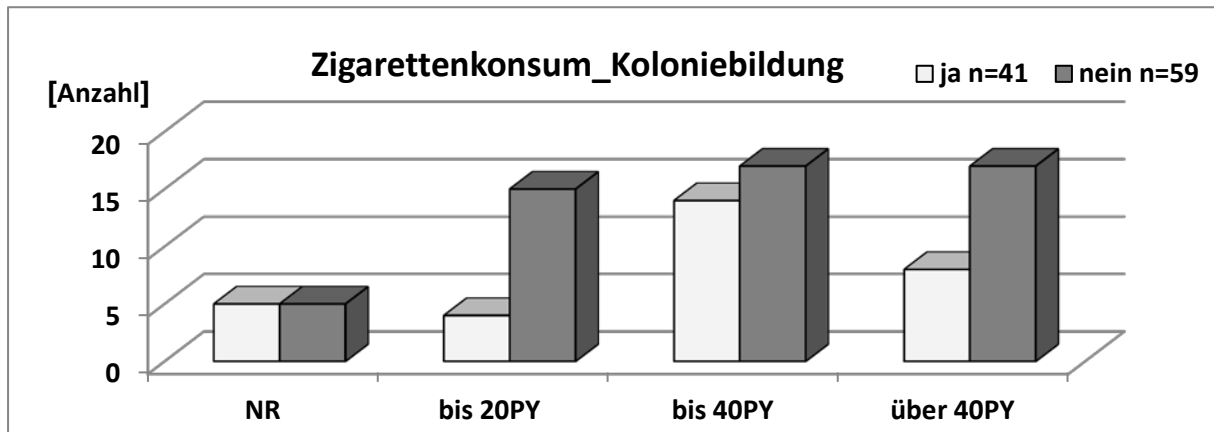


Abb.7 Abhängigkeit der Koloniebildung epithelialer Tumorzellen von dem Zigarettenkonsum bei 100 Tumorproben; NR=Nichtraucher; PY=pack years

3.1.6 Koloniebildungsverhalten unterteilt nach Lokalisation des Primärtumors

Epitheliale Zellen von HNSCC des Oropharynx weisen mit 47% der Tumoren den zahlenmäßig höchsten Anteil bei der Bildung adhärenter Kolonien auf. Während bei HNSCC des Hypopharynx bzw. Larynx mit jeweils 35% wie auch bei der Mundhöhle (33%) weniger adhärenre epitheliale Kolonien in der Kurzzeittestung angezüchtet werden konnten (Abb.8).

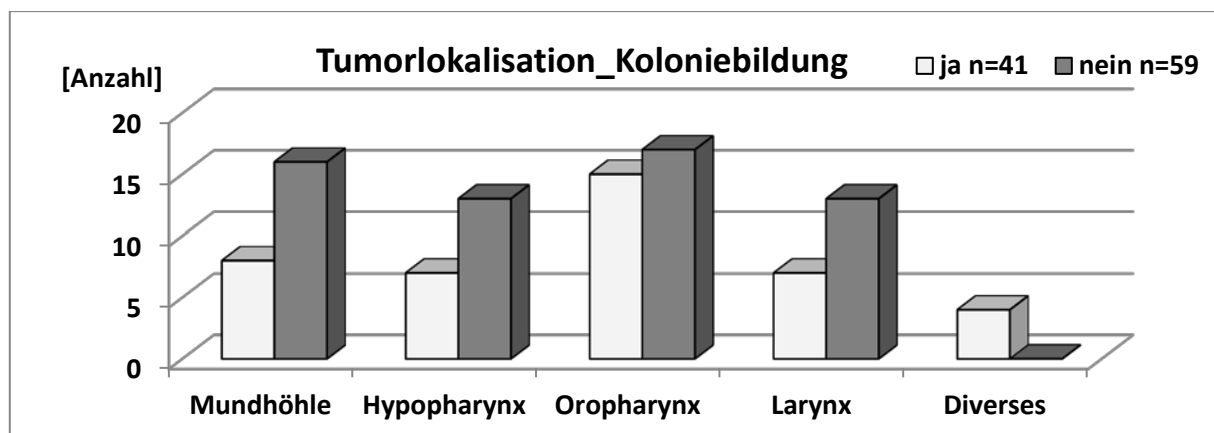


Abb.8 Abhängigkeit der Koloniebildung epithelialer Tumorzellen von der Lokalisation des Primärtumors bei 100 Tumorproben

3.2 Koloniebildung auf verschiedenen EZM-Proteinen und Wirksamkeit von Bestrahlung ohne Chemotherapeutika

Viel wichtiger als der Nachweis einer vorhandenen Koloniebildung ist die Anzahl der gewachsenen Zellkolonien. Erst bei einer ausreichenden Koloniebildungsrate im Kontrollmedium ist eine valide Aussage über die Wirkung von Chemotherapeutika oder Bestrahlung auf die Zellkolonien zu treffen.

3.2.1 Koloniebildung in Abhängigkeit von EZM-Proteinen bei 41 Tumorproben

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode des FLAVINO-Assays bei unterschiedlichen Beschichtungen hier jedoch ohne Chemotherapeutika angewendet, um herauszufinden, ob es Unterschiede im Koloniebildungsverhalten gibt. 96-er Mikrotiterplatten wurden mit Proteinen wie humanes Fibronectin [hFN], Laminin [L], Kollagen [K] und mit diversen extrazellulären Matrices [ECM] beschichtet. Zusätzlich wurden 14 ECM-Platten noch mit 2,2 Gy bestrahlt [ECM-B]. Die Koloniezahl dieser 5 Gruppen ist in den folgenden Abbildungen dargestellt, wobei die oben beschriebene Differenzierung beibehalten wurde (AJCC-Stadium, Alkoholkonsum, Zigarettenkonsum und Tumorlokalisation).

Die Beschichtung mit Kollagen zeigt im Median die zweithöchste Koloniezahl im Kontrollmedium. Im Vergleich zu den Beschichtungen hFN und Laminin sind auf Kollagen signifikant ($p < 0,001$) mehr Kolonien angewachsen (Wilcoxon-Test). Auf Mikrotiterplatten mit mehreren extrazellulären Matrixproteinen (ECM) konnten im Vergleich zu Kollagen im Median 4 Kolonien weniger ausgezählt werden. Nach Bestrahlung der ECM-Platten mit 2,2 Gy, wurde die Koloniebildung so stark angeregt, dass im Median eine Kolonie mehr ausgezählt werden konnte als bei den Platten, die mit Kollagen beschichtet waren mit einer Signifikanz von $p < 0,036$ (Wilcoxon-Test).

In Abbildung 9 ist zusätzlich die Koloniebildungsrate der verschiedenen Beschichtungen in Relation zur bestrahlten ECM-Beschichtung (100%) dargestellt.

Würde der Mittelwert der Koloniebildung als Referenz genommen werden, ändert sich die Reihenfolge; die höchste Koloniebildungsrate besteht jetzt bei der Kollagenbeschichtung, gefolgt von der Beschichtung mit ECM (Abb.10), jedoch ohne Signifikanz.

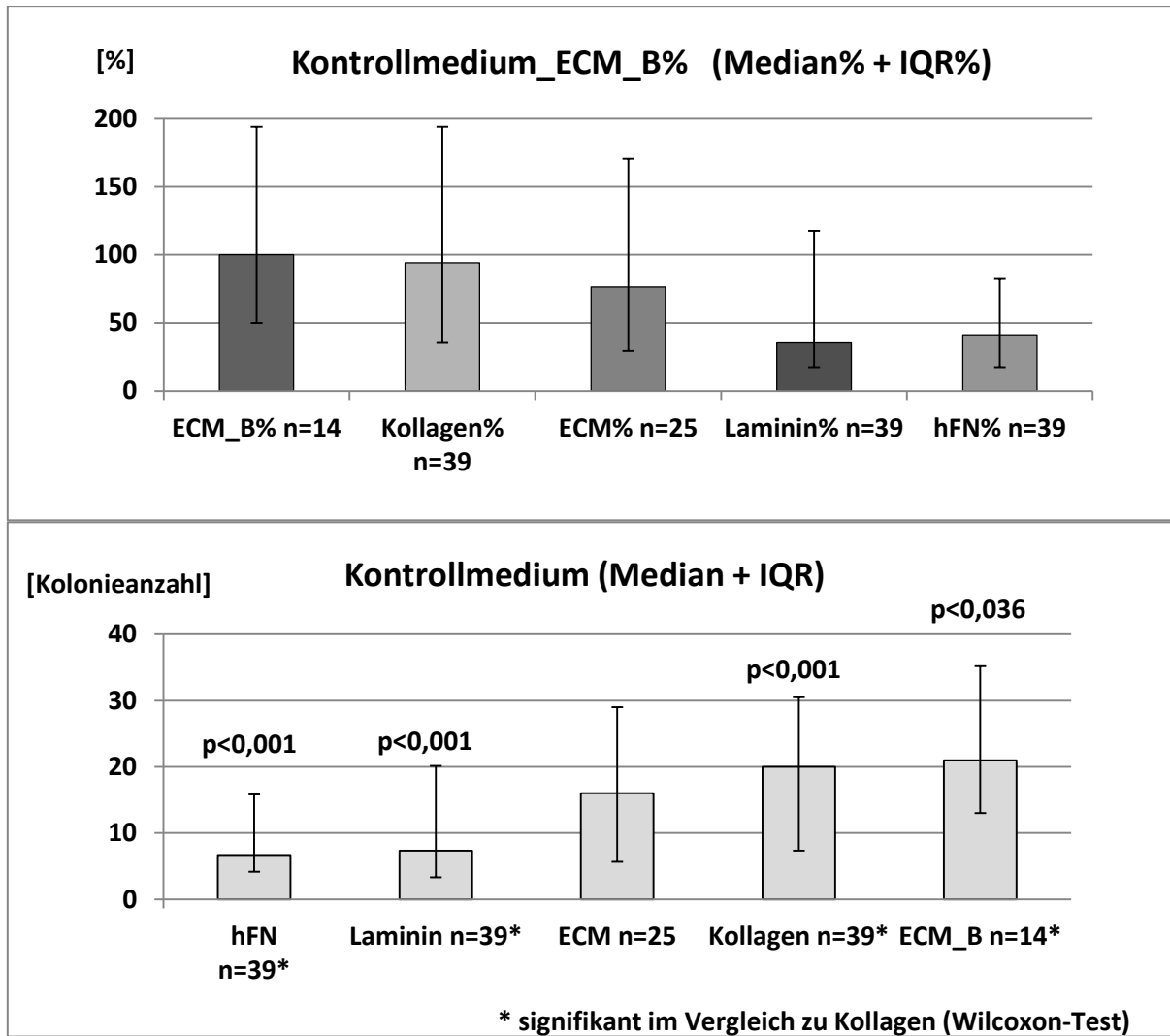


Abb.9 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) sowie die prozentuale Verteilung in Bezug auf die bestrahlte ECM-Platte für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika

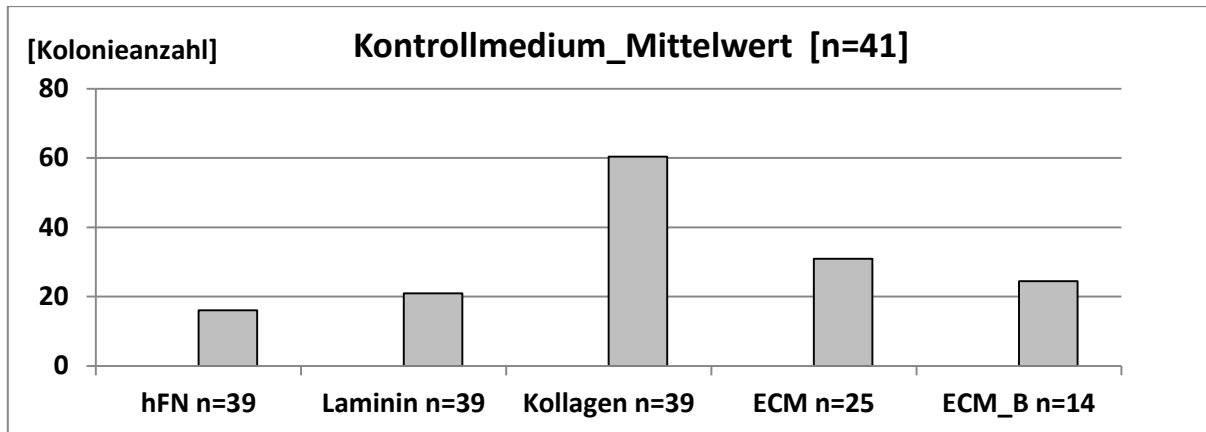


Abb.10 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Mittelwerte für humanes Fibronektin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika

3.2.2 Koloniebildung in Abhängigkeit von EZM-Proteinen und AJCC-Stadium

Aufgelistet nach dem jeweiligen AJCC-Stadium kann unter Betrachtung der Mittelwerte die Aussage getroffen werden, dass vor allem Tumore des Stadiums I auf der Beschichtung hFN gut anwachsen. Tumore im Stadium I, II und IVA zeigen auf Kollagen gute Koloniebildungsraten. Bei Stadium I-Tumoren überzeugt die Beschichtung mit Laminin, bei Tumoren im Stadium II zeigen die ECM-Platten gute Koloniebildungseigenschaften. Eine anschließende Bestrahlung der ECM-Platte führt bis auf Stadium-I und IVB-Tumore im Mittelwert immer zu einer Zunahme der Kolonieanzahl (Abb.11). Alle Werte zeigen jedoch keinen signifikanten Unterschied im Koloniebildungsverhalten bei den verschiedenen Beschichtungen.

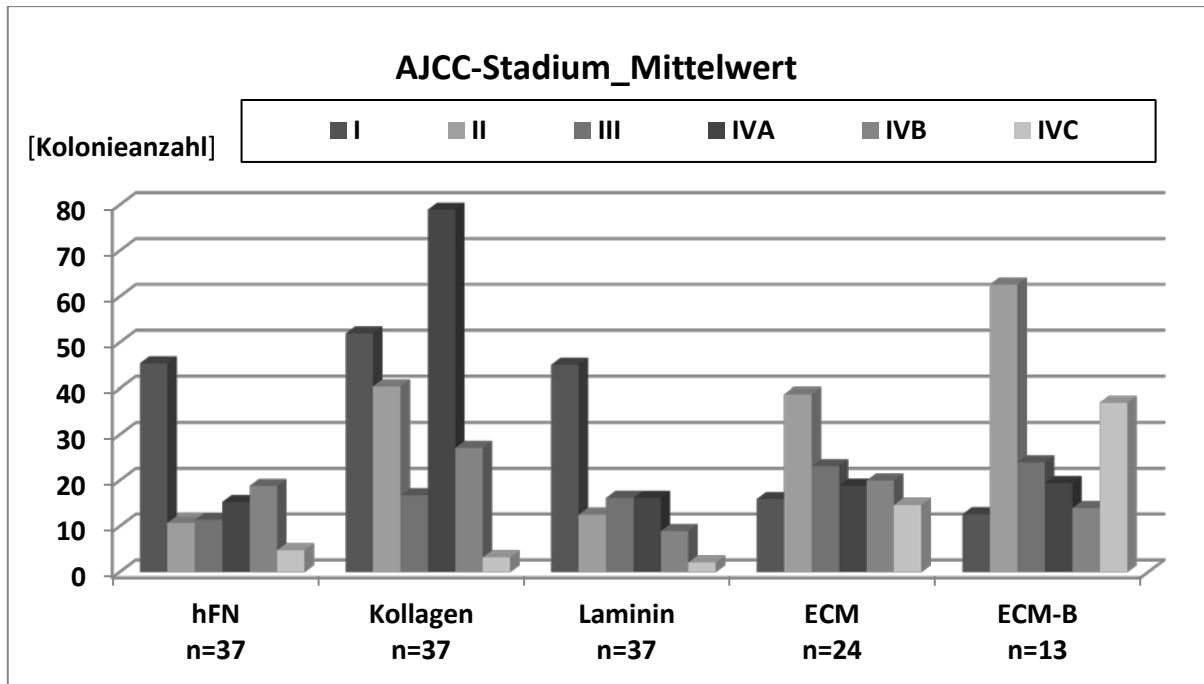


Abb.11 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Mittelwerte für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach AJCC-Stadium

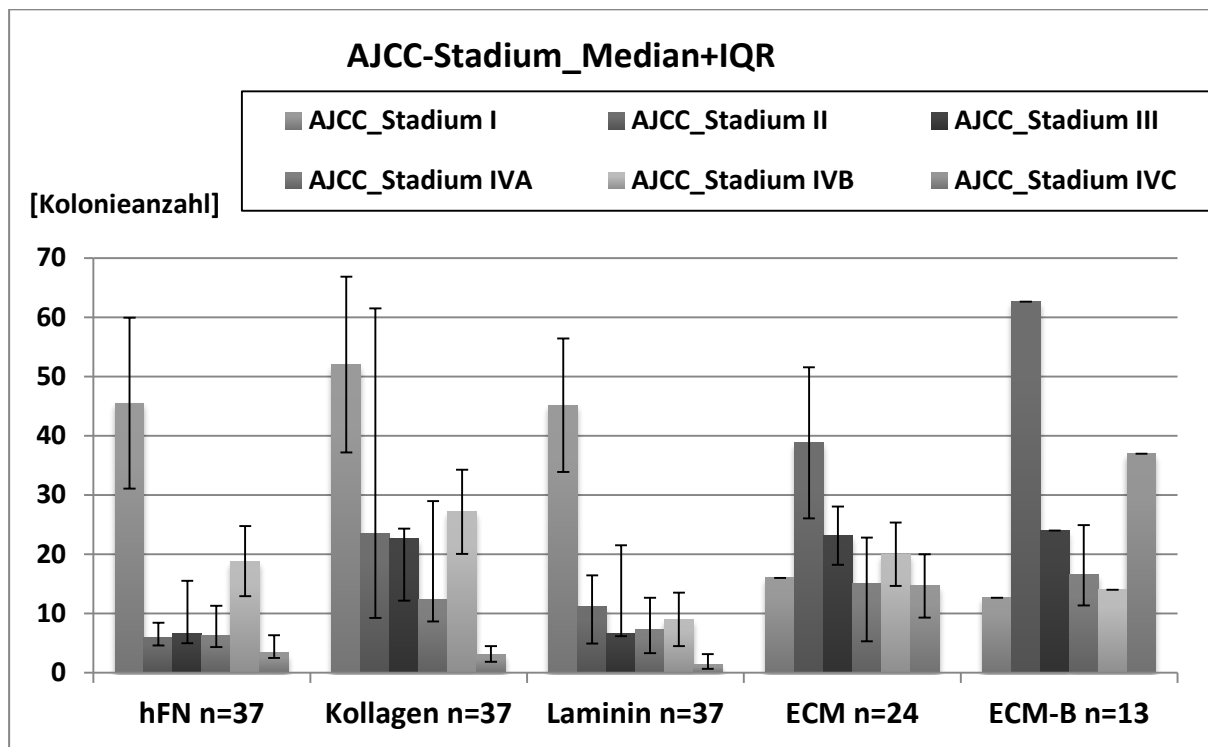


Abb.12 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach AJCC-Stadium

Zur statistischen Vervollständigung sind in Abbildung 12 die jeweiligen Mediane mit zugehöriger Interquartilrange bezüglich AJCC-Stadium und Beschichtung dargestellt. Abweichend verhalten sich Tumore im Stadium IVA, die auf beiden ECM-Platten die besten Koloniebildungsraten zeigen. Hier zeigt die bestrahlte ECM-Platte sogar ein signifikant besseres Koloniebildungsverhalten von HNSCC im Stadium IVA als die korrespondierenden Kollagenplatten ($p < 0,012$). HNSCC-Tumore des Stadiums IVA wachsen hingegen signifikant besser auf Kollagen an im Vergleich zu Laminin ($p < 0,004$) und hFN ($p < 0,016$) (Wilcoxon-Test).

3.2.3 Koloniebildung in Abhängigkeit von EZM-Proteinen und Alkoholkonsum

Betrachtet man das Risikoprofil von HNSCC-Patienten zeigt sich im Mittel bezüglich des Koloniewachstums im Kontrollmedium folgendes Bild: Konsumierten die Patienten keinen Alkohol, wurde die größte Koloniebildung auf Kollagenplatten beobachtet. Patienten mit einem täglichen Alkoholkonsum von bis zu 60 g zeigen eine höhere Koloniebildungsrate als bei einem täglichen Alkoholkonsum von 30 g. Wird die Grenze von 60 g Alkohol pro Tag jedoch überschritten, führt dies zu geringeren Koloniebildungsraten der HNSCC-Zellen bei allen fünf Beschichtungen. Unter Bestrahlung kommt es bei der Patientengruppe mit einem täglichen Alkoholkonsum von bis zu 60 g zu einer Erhöhung der Tumorkoloniebildung um 38% im Vergleich zur nicht bestrahlten ECM-Platte (Abb.13).

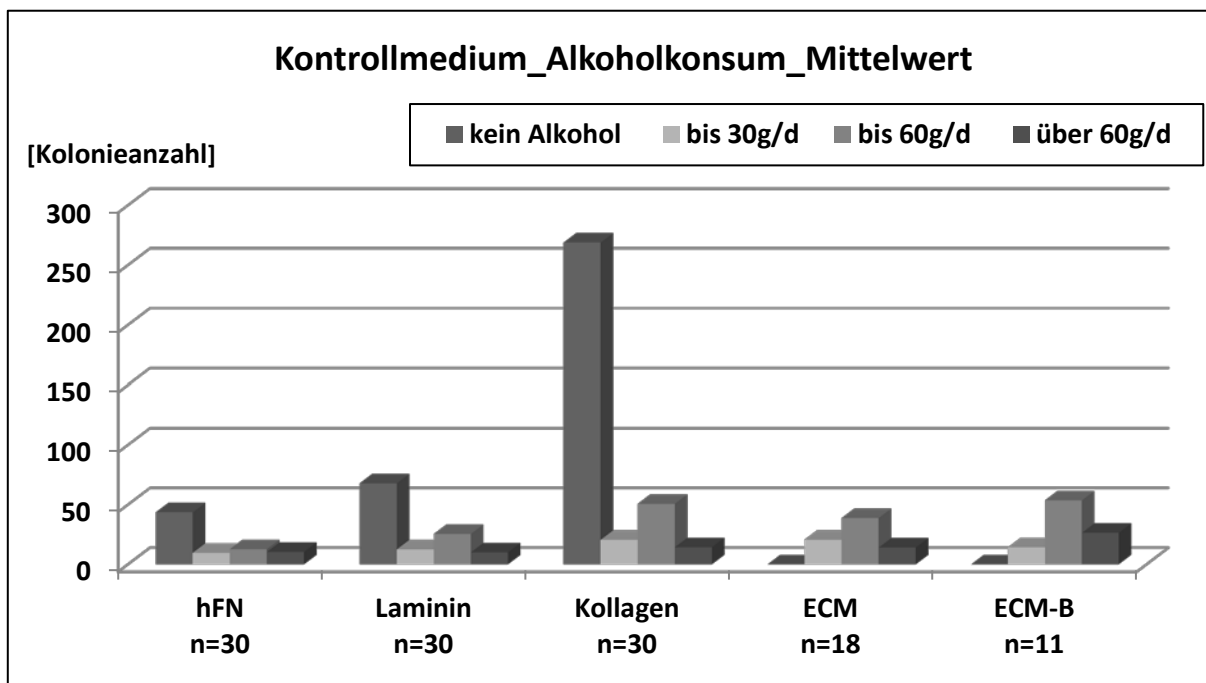


Abb.13 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Mittelwerte für humanes Fibronektin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach Alkoholkonsum

Betrachtet man die Mediane der Koloniebildung bei den unterschiedlichen Beschichtungen, so gestaltet sich der Trend ähnlich. Konsumieren Patienten keinen Alkohol, so zeigen die HNSCC die besten Koloniebildungsraten auf hFN-Platten. HNSCC von Patienten mit einem täglichen Konsum von 30 g Alkohol zeigen auf Kollagen das beste Koloniebildungsverhalten. Deutliche Steigerungen in der HNSCC-Koloniebildung kann bei Patienten mit einem Alkoholkonsum von bis zu und über 60 g pro Tag durch Bestrahlung der ECM-Platte erzielt werden. Alle Werte sind jedoch nicht signifikant (Abb.14).

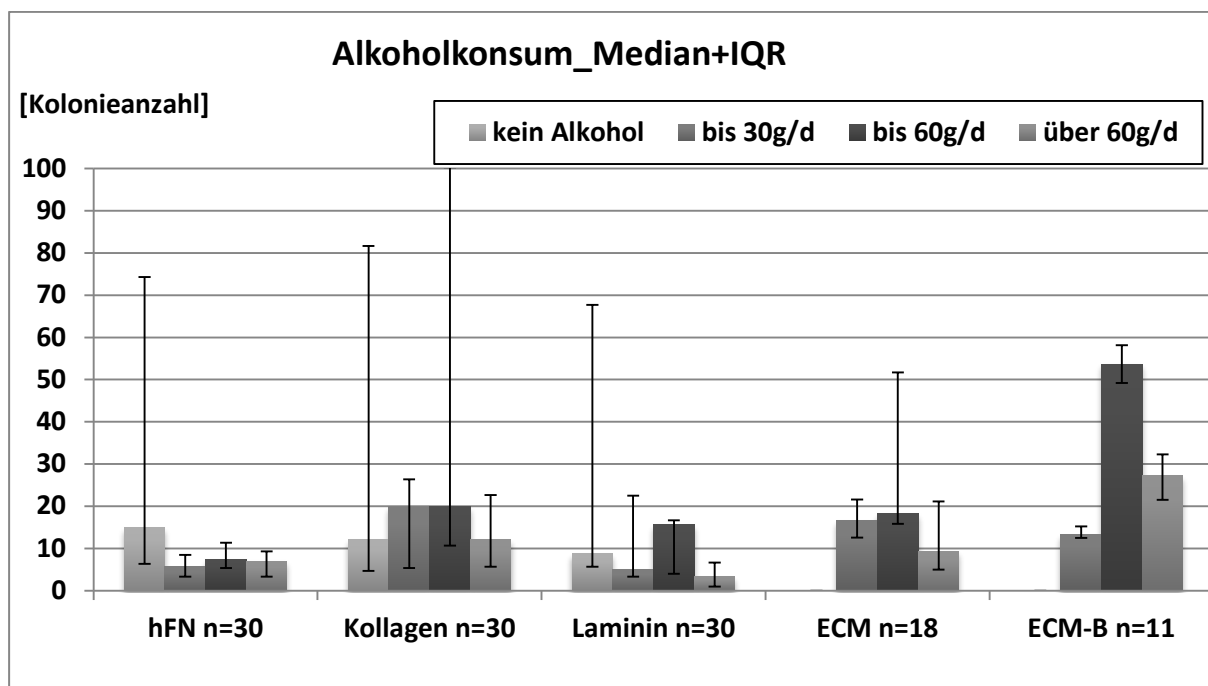


Abb.14 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach Alkoholkonsum

3.2.4 Koloniebildung in Abhängigkeit von EZM-Proteinen und Zigarettenkonsum

Unter dem Einfluss des Zigarettenkonsums auf die Koloniebildung ergibt sich folgender Sachverhalt: Interessanterweise findet man bei HNSCC von Patienten mit mehr als 40 PY auf allen Beschichtungen und vor allem auf Kollagenplatten das größte Koloniewachstum. HNSCC von Rauchern mit bis zu 40 PY zeigen jedoch eine schlechtere Koloniebildung auf den Beschichtungen Laminin, Kollagen und ECM im Vergleich zu HNSCC von Patienten mit bis zu 20 PY. HNSCC von Nichtrauchern zeigen auf alle Beschichtungen ein reduziertes Koloniebildungsverhalten im Vergleich zu HNSCC von starken Rauchern. Wurde die ECM-Platte im Anschluss noch bestrahlt, so konnte das Koloniebildungsverhalten ab einem Zigarettenkonsum von 20 PY kontinuierlich erhöht werden (Abb.15).

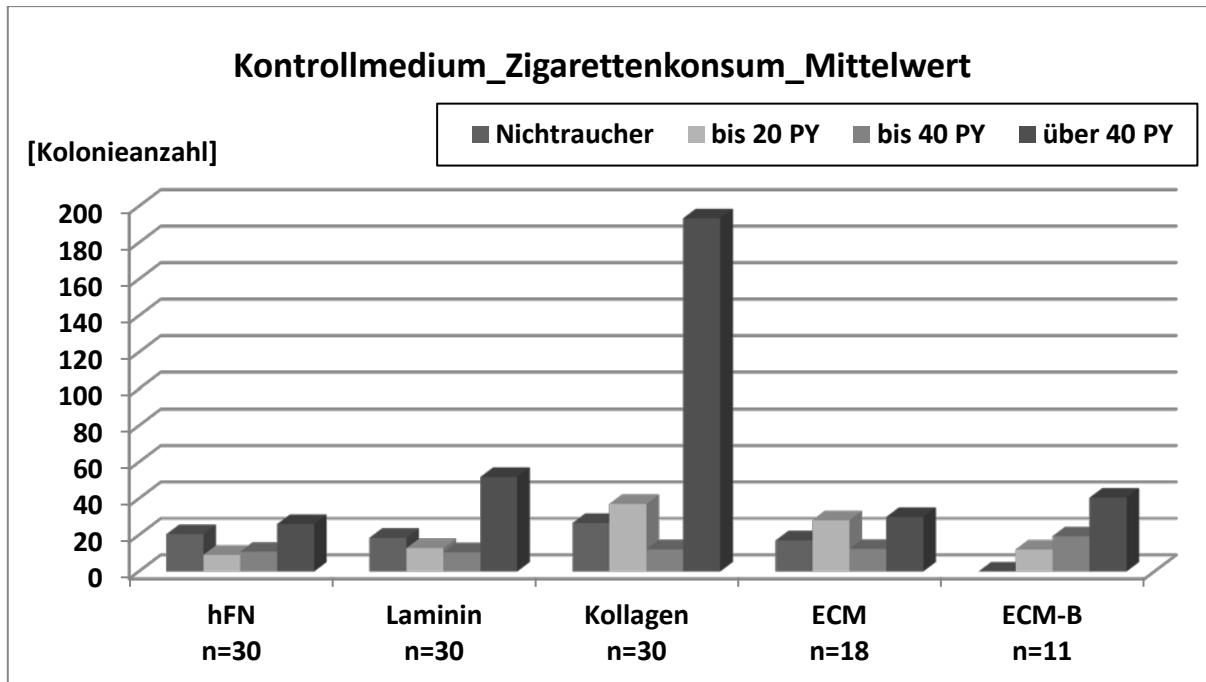


Abb.15 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Mittelwerte für humanes Fibronektin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach Zigarettenkonsum

Zur Vervollständigung wurden die jeweiligen Mediane ebenfalls graphisch dargestellt. Bei den HNSCC von Nichtrauchern zeigen die ECM-Platten das beste Koloniebildungsverhalten. Tumorproben von Patienten mit einem Zigarettenkonsum von bis zu 20 PY wachsen signifikant ($p=0,049$) besser auf Kollagen an im Vergleich zu Laminin, bei den Patienten mit bis zu 40 PY signifikant ($p=0,046$) besser auf Kollagen im Vergleich zu hFN (Wilcoxon-Test). HNSCC von Patienten mit mehr als 40 PY zeigen eine erhöhte Koloniebildungsrate (+65%) nach Bestrahlung der ECM-Platten im Vergleich zu den normalen ECM-Platten (Abb.16).

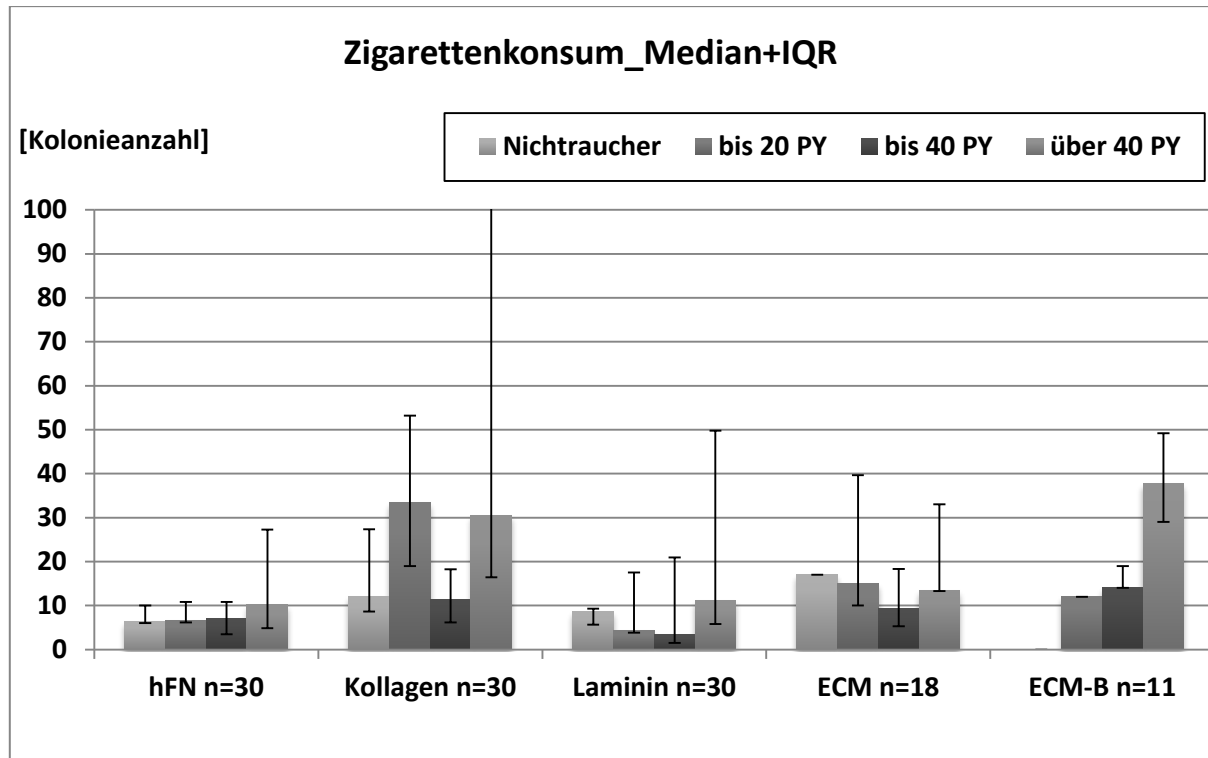


Abb.16 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach Zigarettenkonsum

3.2.5 Kolonieanzahl in Abhängigkeit von EZM-Proteinen und Tumorlokalisation

Die Frage, ob die Lokalisation der primären HNSCC auf den vier unterschiedlichen Beschichtungen differentes Koloniebildungsverhalten bedingt, wurde ebenfalls untersucht. Hervorzuheben ist, dass Oropharynx-tumore eine maximale Koloniebildungsrate auf Kollagenplatten aufweisen. Bei Hypopharynx- und Larynx-tumoren zeigen alle vier Beschichtungen ein ähnlich reduziertes Wachstumsverhalten. Tumore der Mundhöhle wachsen gut auf Kollagen an. Wird die ECM-Platte der gleichen Lokalisation bestrahlt, zeigt sie im Vergleich zur normalen ECM-Platte ein Zuwachs der Koloniebildung um 55% (Abb.17).

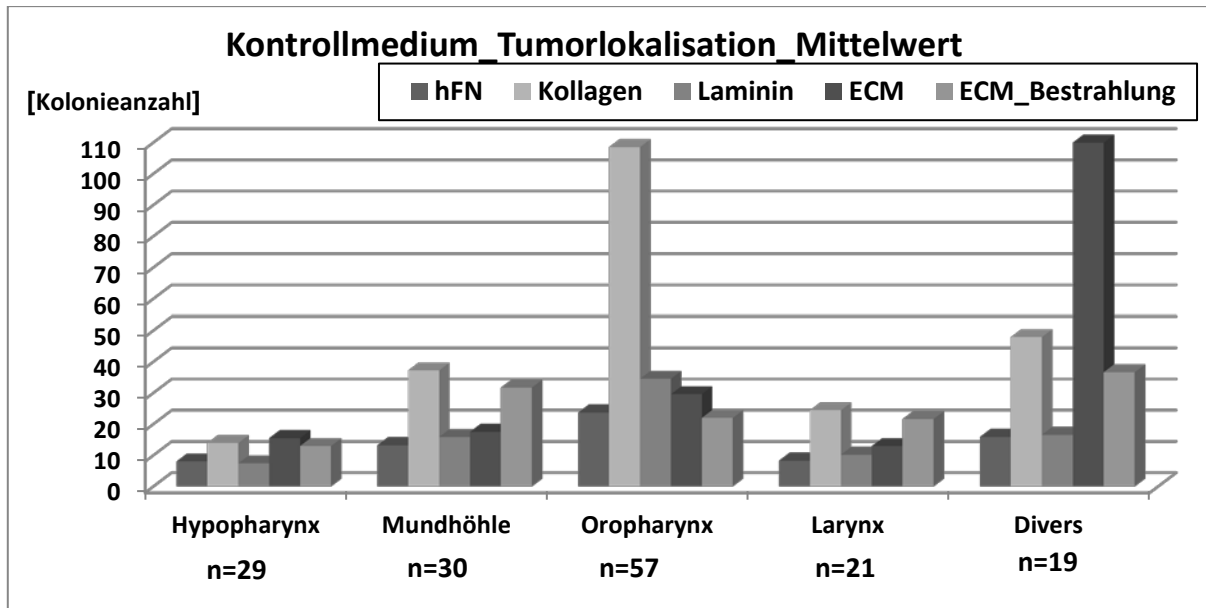


Abb.17 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Mittelwerte für humanes Fibronektin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach Tumorlokalisation des Primärtumors

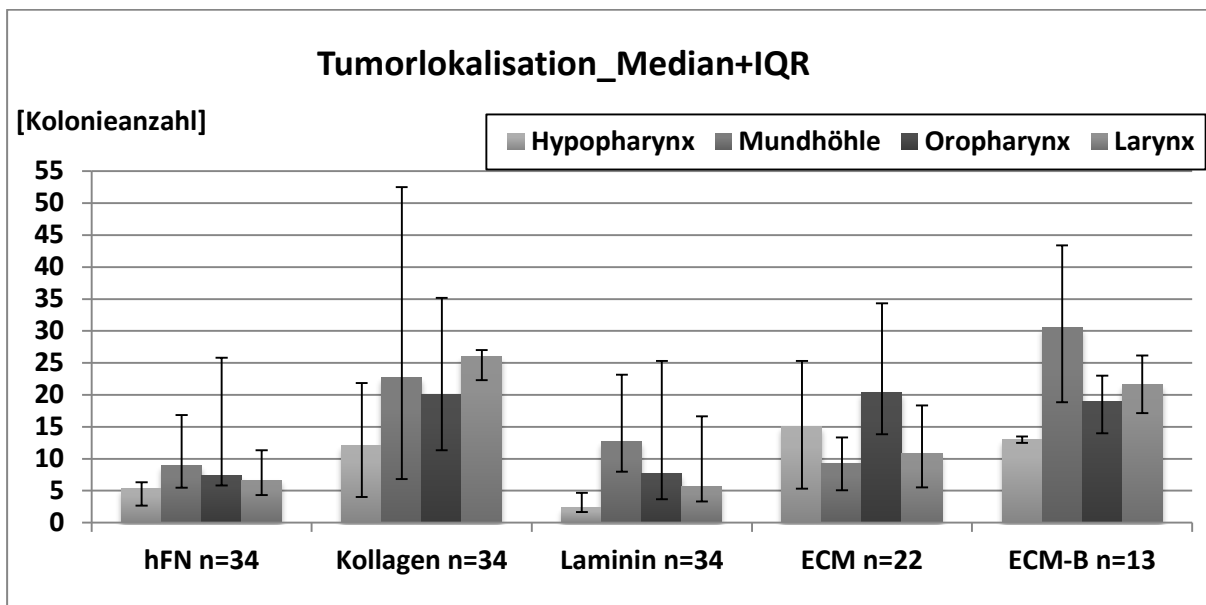


Abb.18 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronektin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach Tumorlokalisation des Primärtumors

Aufgelistet nach dem Median und der Interquartilrange [IQR] ergibt sich bei der Koloniezahl ein gänzlich anderes Bild unter Betrachtung der Tumorlokalisation. Während bei der hFN-Beschichtung die Koloniezahl bei allen Tumorlokalisationen gering bleibt, ist das Koloniewachstum auf der Kollagenbeschichtung bei allen Lokalisationen deutlich gesteigert.

Oropharynxkarzinome wachsen signifikant besser auf Kollagen an im Vergleich zu Laminin ($p=0,005$) und im Vergleich zu hFN ($p=0,038$). Dementsprechend wachsen Larynxkarzinome besser auf Kollagen an im Vergleich zu hFN ($p=0,043$). Ebenfalls positiv ist der Einfluss der Bestrahlung bei der ECM-Beschichtung im Vergleich zur nicht bestrahlten ECM-Platte bei den Lokalisationen Mundhöhle und Larynx (Abb.18).

3.3 Chemoresponsetestung Cilengitide und Cetuximab bei HNSCC

3.3.1 Koloniebildung unter dem Einfluss von Cil und Cetux unterteilt nach Beschichtung und Bestrahlung

In der vorliegenden Arbeit wurde auf vier verschiedenen Beschichtungen getestet, inwieweit sich das Koloniebildungsverhalten der HNSCC unter Wirkung der Chemotherapeutika 10 μ M Cil und 66,6 μ g/ml Cetux und beide in Kombination ändert. Zusätzlich wurde jeweils noch eine ECM-Platte mit 2,2 Gy bestrahlt (Abb.19).

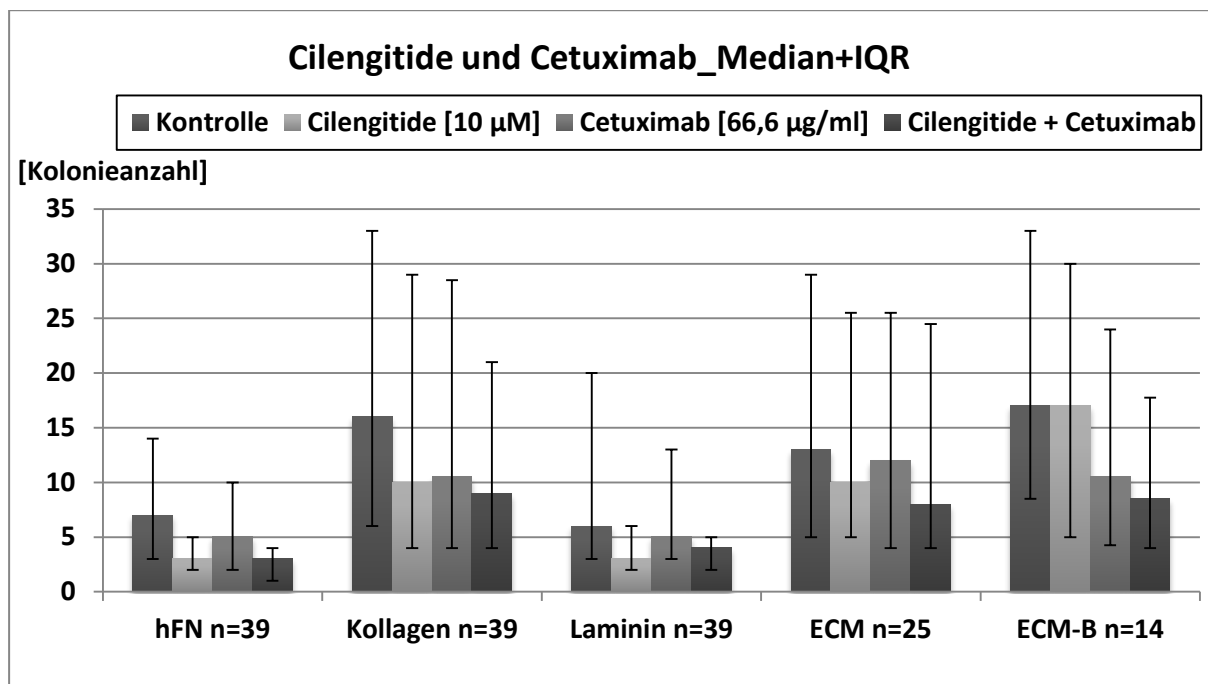


Abb.19 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen unter dem Einfluss von Cil, Cetux und in Kombination

Cil führt bis auf die ECM-Beschichtung mit anschließender Bestrahlung im Median zu einem Rückgang der Koloniebildung. Dieser reduzierende Effekt ist am stärksten bei der Beschichtung mit hFN (-58%). HNSCC auf der Beschichtung mit Laminin oder hFN reagieren signifi-

kant stärker koloniereduktiv auf Cil im Vergleich zur ECM-Beschichtung ($p<0,001$). Cil übt ebenfalls einen signifikant stärkeren koloniereduktiven Effekt auf HNSCC mit den Beschichtungen Laminin ($p=0,002$) und hFN ($p<0,001$) aus im Vergleich zur Kollagenbeschichtung. Bestrahlte ECM-Platten mit HNSCC beschichtet reagieren signifikant geringer auf Cil als mit Laminin ($p=0,019$) oder hFN ($p=0,009$) beschichtete Platten (U-Test). Im arithmetischen Mittel sieht man die stärksten reduzierenden Effekte bei der Lamininbeschichtung (-77%) und bei der hFN-Beschichtung (-72%). Werden die ECM-Platten bestrahlt, so kommt es unter Einfluss von Cil zu einer Zunahme der Koloniezahzahl im Mittel um 11% im Vergleich zur unbestrahlten ECM-Platte. Cetux allein führt im Median nur bei der Kollagenbeschichtung (-34%) zu einem deutlichen Rückgang der Koloniezahzahl. Im Mittel verzeichnet man den größten Rückgang der HNSCC bei der Kollagenbeschichtung (-30%). In Kombination mit Cil reduziert Cetux die Koloniezahzahl von HNSCC im Median von 33% (Laminin) bis 57% (hFN). Signifikante Unterschiede bestehen zwischen dem koloniereduktiven Verhalten beider Medikamente auf HNSCC bei den Platten ECM im Vergleich zur stärkeren Zytotoxizität bei Laminin ($p=0,004$) und hFN ($p=0,002$) bzw. bei den Platten Kollagen im Vergleich zu Zytotoxizität bei Laminin ($p=0,013$) und hFN ($p=0,007$). In Bezug auf den Mittelwert reduziert sich die Koloniezahzahl um rund 75% bei hFN und Laminin (Tab.5).

Tab.5 Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei 4 Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination

Mittelwert Koloniezahzahl / Beschichtung	Kontrolle	10 μ M Cilengitide	66,6 μ g/ml Cetuximab	10 μ M Cilengitide + 66,6 μ g/ml Cetuximab
hFN [n=39]	16,08	4,57	14,44	4,87
Kollagen [n=39]	60,42	46,44	43,46	36,42
Laminin [n=39]	20,96	4,96	14,70	5,41
ECM [n=25]	30,89	30,32	25,76	22,60
ECM_B [n=14]	24,50	27,17	21,14	15,21

3.3.2 Koloniebildung unter dem Einfluss von Cil und Cetux unterteilt nach Beschichtung und Bestrahlung in Abhängigkeit der Tumorlokalisation

Karzinome im Bereich der Mundhöhle zeigen im Median (Abb.20) auf Kollagenplatten unter Zugabe von Cil einen Zuwachs der Koloniezahzahl um den Faktor 2.0. Cetux hingegen führt zu einer starken Koloniereduktion (-69%). Konträr dazu verhält sich das Koloniebildungsver-

halten bei den ECM-Platten mit anschließender Bestrahlung; die Gabe von Cetux führt hier zu einem Koloniewachstum um den Faktor 2,6, Cil hingegen zu einer Reduktion der Kolonien (-26%). Cil bewirkt im Mittel auf Laminin bei insgesamt schlechteren Koloniebildungsraten einen Kolonierückgang um 72% und auf hFN um 42% (Tab.6). Kombiniert man Cil mit Cetux so ergibt sich im Median eine Reduktion der adhärennten Tumorzellen um 30%. Das Ergebnis der Adhärenz auf bestrahlten ECM-Platten ist bei Kombination beider Chemotherapeutika gegenüber der Kontrolle unverändert.

Tab.6 Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei 4 Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Mundhöhlenkarzinomen

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	Kontrolle	10 µM Cilengitide	66,6 µg/ml Cetuximab	10 µM Cilengitide + 66,6 µg/ml Cetuximab
hFN [n=7]	13,28	7,76	13,76	4,81
Kollagen [n=7]	37,24	42,09	25,67	29,34
Laminin [n=7]	15,91	4,52	13,48	6,09
ECM [n=6]	17,55	11,61	16,50	14,00
ECM_B [n=4]	31,75	19,67	41,92	23,42

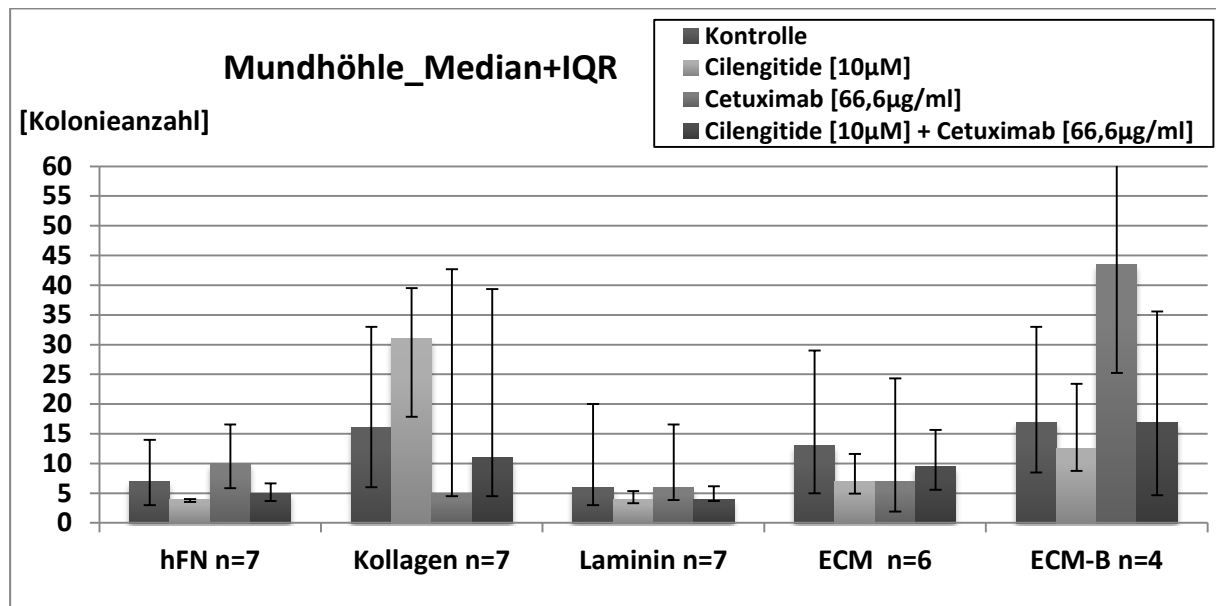


Abb.20 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronektin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Mundhöhlenkarzinomen

Hypopharynxkarzinome zeigen bis auf die Kollagenplatten im Median ein ähnliches Verhalten wie Mundhöhlenkarzinome (Abb.21). HNSCC in Verbindung mit Cil führen auf Kol-

lagenplatten im Median zu einer Reduktion der Kolonieanzahl um 60% und mit Cetux sogar zu einer Reduktion um 79%. Beide Chemotherapeutika in Kombination ergeben keine besseren Ergebnisse (75%). Cil in Kombination mit Bestrahlung zeigt nur einen Kolonierückgang um 26%. Im Mittel kann Cil auf Kollagen nur minimal die Kolonieanzahl von HNSCC reduzieren und Cetux führt auch nur zu einer Reduktion von 41%. Cil und Cetux zusammen reduzieren im Mittel das Koloniebildungsverhalten um 61% (Tab.7).

Tab.7 Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei 4 Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Hypopharynxkarzinomen

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	Kontrolle	10 µM Cilengitide	66,6 µg/ml Cetuximab	10 µM Cilengitide + 66,6 µg/ml Cetuximab
hFN [n=7]	8,05	2,57	4,24	1,71
Kollagen [n=7]	15,10	15,24	8,95	5,86
Laminin [n=7]	7,71	3,19	3,57	3,00
ECM [n=5]	15,53	15,67	11,80	10,54
ECM_B [n=2]	13,00	15,50	3,84	8,84

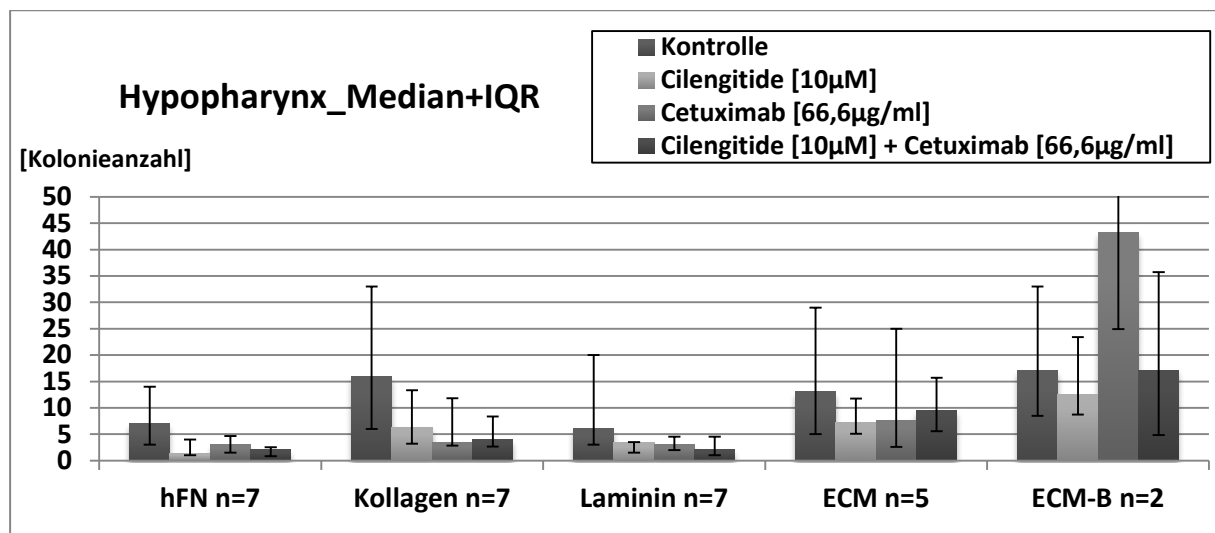


Abb.21 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Hypopharynxkarzinomen

Oropharynxkarzinome weisen im Median unter Cil nur auf den Beschichtungen hFN und Kollagen eine gute Koloniereduktion bis zu 48% auf, bei den Beschichtungen Laminin und ECM findet keine Koloniereduktion statt. HNSCC zeigen unter Bestrahlung und Cil ein verstärktes Koloniebildungsverhalten (+41%) (Abb.22). Im Mittelwert kann auf Kollagen unter Cil-Gabe

nur eine Reduktion von 35% erzielt werden, die durch zusätzliche Gabe von Cetux leicht gesteigert werden kann (+4%) (Tab.8).

Tab.8 Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei 4 Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Oropharynxkarzinomen

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	Kontrolle	10 µM Cilengitide	66,6 µg/ml Cetuximab	10µM Cilengitide + 66,6 µg/ml Cetuximab
hFN [n=15]	23,75	4,82	23,20	7,56
Kollagen [n=15]	108,56	70,80	79,67	66,00
Laminin [n=15]	34,56	5,24	24,93	6,07
ECM [n=7]	29,62	31,95	35,24	26,52
ECM_B [n=5]	22,00	22,80	15,00	11,27

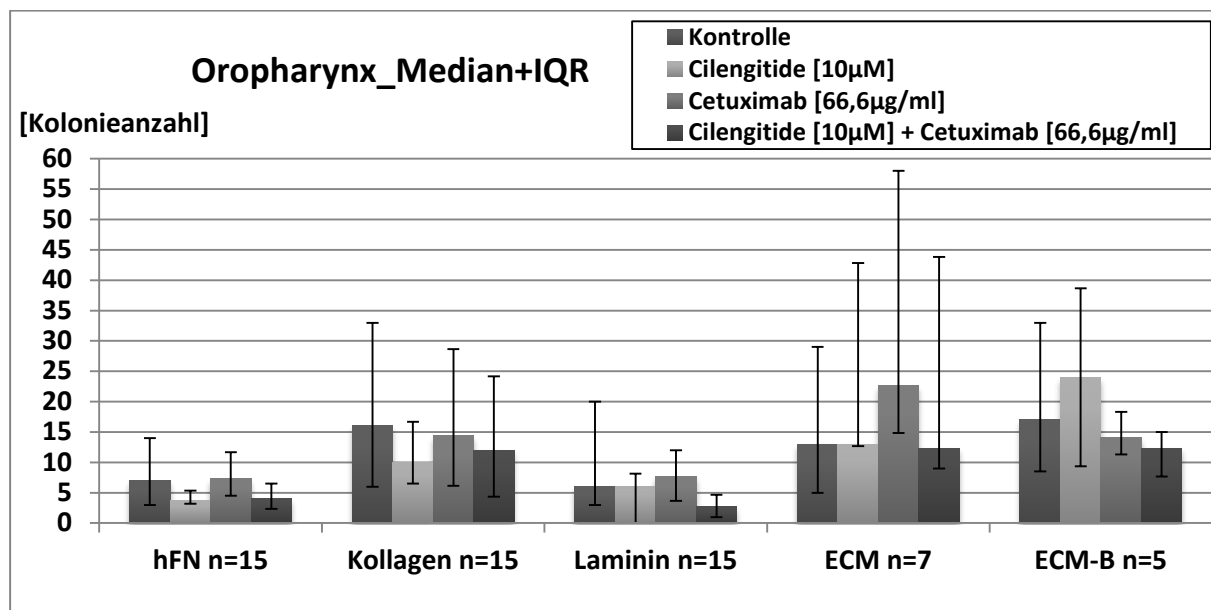


Abb.22 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Oropharynxkarzinomen

Larynxkarzinome zeigen im Median unter Cil-Gabe auf der Beschichtung hFN die beste koloniereduktive Wirkung (71%). In Kombination mit Cetux wird auf der Beschichtung Kollagen das Koloniebildungsverhalten sogar mehr als im Kontrollmedium angeregt (+37%). Eine Ausnahme bilden die bestrahlten ECM-Platten, wobei Cetux alleine und in Kombination mit Cil fast gleichwertige reduktive Wirkung zeigt (Abb.23). Im Mittelwert ist bei insgesamt schlechter Koloniebildungsrate auf Lamininbeschichtung unter dem Einfluss von Cil eine

Koloniereduktion von 51% und auf hFN von 57% erzielt worden. Cetux kann diese Reduktionsrate nicht erhöhen (Tab.9).

Tab.9 Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei 4 Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Larynxkarzinomen

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	Kontrolle	10 μ M Cilengitide	66,6 μ g/ml Cetuximab	10 μ M Cilengitide + 66,6 μ g/ml Cetuximab
hFN [n=5]	8,33	3,60	7,87	3,73
Kollagen [n=5]	24,47	13,54	25,54	16,80
Laminin [n=5]	10,20	5,00	8,73	6,47
ECM [n=4]	13,00	10,83	11,17	12,00
ECM_B [n=2]	21,67	16,34	6,83	5,17

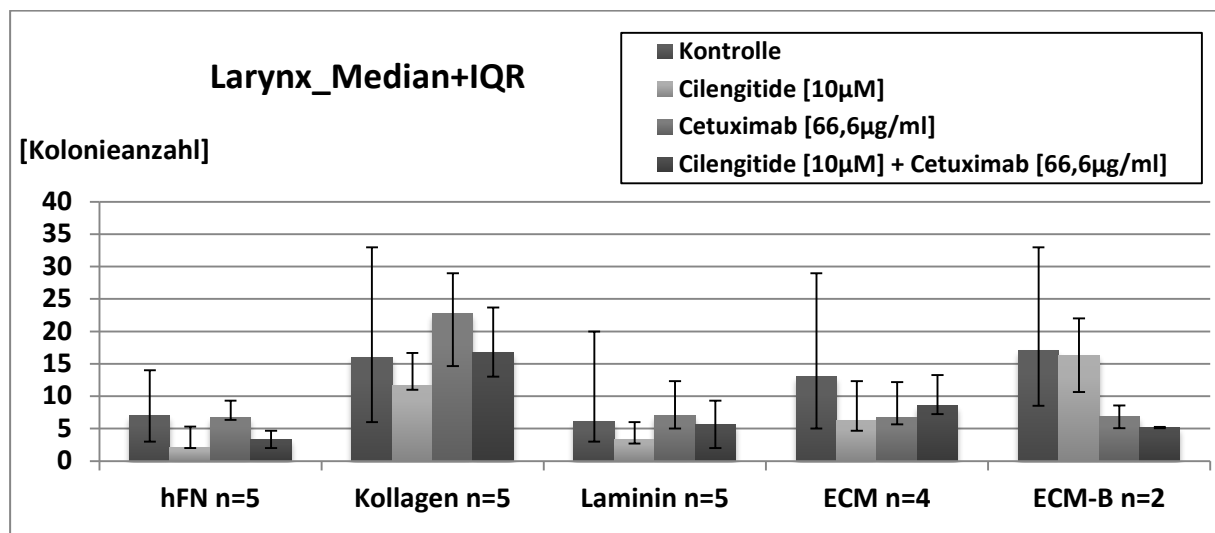


Abb.23 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Larynxkarzinomen

3.4 Chemoresponsetestung Cisplatin und Docetaxel bei HNSCC

3.4.1 Koloniebildung unter dem Einfluss von Cis und DTX unterteilt nach Beschichtung und Bestrahlung

Gemäß der Erwartung wird die Koloniebildung von den konventionellen Zytostatika deutlich reduziert. So zeigt sich bei Cis in der Konzentration von 6,667 μ M im Median bei allen Beschichtungen eine fast vollständige Tumorzellvernichtung, was 1 TPL entspricht. Im Vergleich hierzu geht die Koloniereduktion bei der Gabe von 3,333 μ M Cis um rund 80% zu-

rück. Auch bei der Reduktion der DTX-Konzentration auf 275 nM ergibt sich eine bis auf 30% geringere Absterberate. Die ECM-Platten bilden eine Ausnahme, zeigen aber nach Bestrahlung wieder regelrechtes Verhalten. 550 nM DTX verringert die Koloniebildung von HNSCC um maximal 70% (hFN). Eine inverse Situation zeigt sich auf den ECM-Platten, hier ist die Konzentration mit 275 nM DTX um rund 10% wirksamer als 550 nM (Abb.24). Bei den Mittelwerten ist die beschriebene Tendenz noch ausgeprägter. Hier reduziert sich die Koloniebildung um rund 90% bei Gabe des Zytostatikums Cis in der Dosierung 6,667 μ M (Tab.10).

Tab.10 Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cisplatin und Docetaxel

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	Kontrolle	3.333 μ M Cisplatin	6.667 μ M Cisplatin	275 nM Docetaxel	550 nM Docetaxel
hFN [n=39]	16,08	5,55	1,22	7,53	6,91
Kollagen [n=39]	60,42	16,81	7,82	36,91	28,62
Laminin [n=39]	20,96	5,23	1,79	8,54	6,38
ECM [n=25]	30,89	8,22	1,96	14,10	13,46
ECM_B [n=14]	24,50	4,18	2,54	14,93	6,29

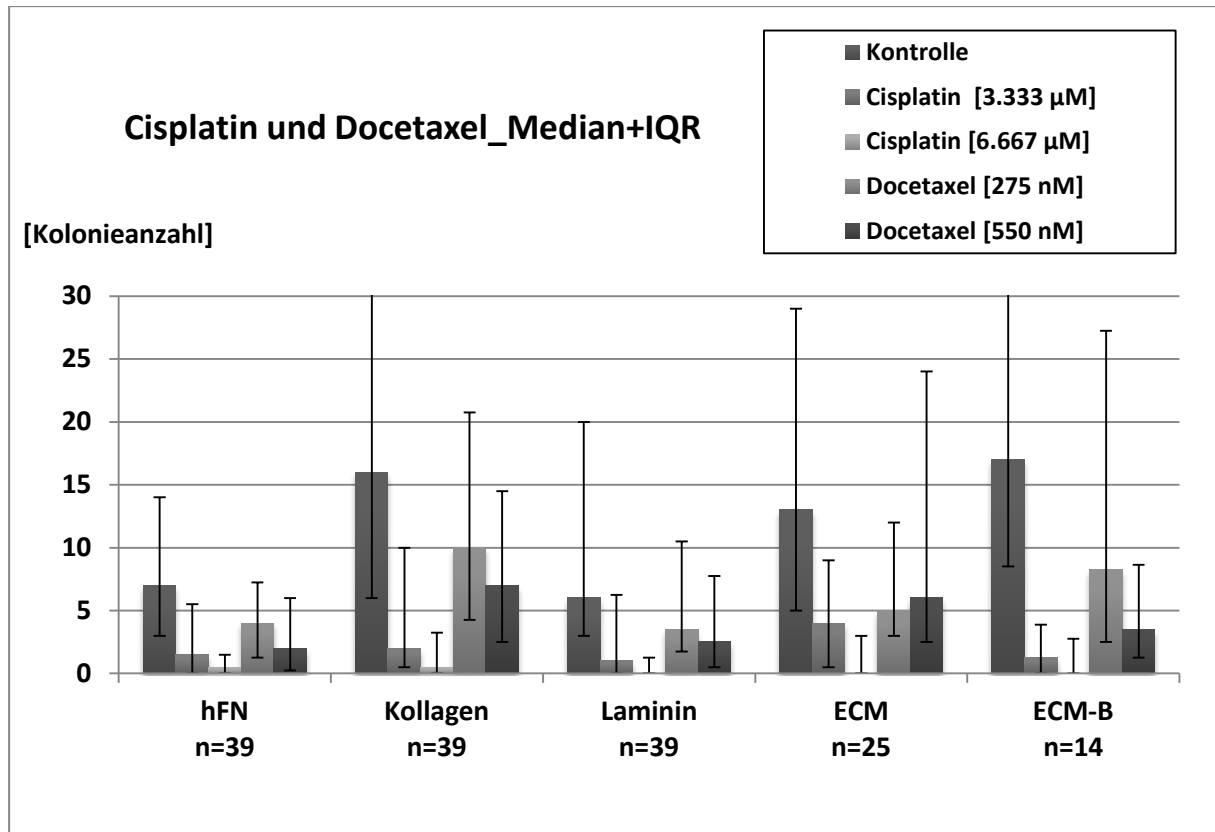


Abb.24 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cisplatin und Docetaxel in den Konzentrationen von 1 und $\frac{1}{2}$ TPL

3.5 Einfluss der Zytostatika Cisplatin, Docetaxel, Cetuximab und Cilengitide auf das Koloniebildungsverhalten bei unterschiedlichen Konzentrationen in binärer Kombination

3.5.1 Cis und DTX

Bei der Kombination von Cis und DTX nimmt Cis im Median eine dominante koloniereduktive Rolle ein. Bei der Verwendung von Cis in der Dosierung von 6,667 µM und DTX in absteigender Konzentration werden die Tumorzellen maximal inaktiviert. 6,667 µM Cis bewirkt bei HNSCC auf der bestrahlten ECM-Platte mit 550 nM DTX ($p=0,032$), 137,5 nM DTX ($p=0,026$) bzw. 275 nM DTX ($p=0,036$) eine signifikant stärkere Koloniereduktion im Vergleich zur hFN-Platte. Ebenfalls reduziert 6,667 µM Cis bei HNSCC auf der bestrahlten Platte das Koloniebildungsverhalten signifikant ($p=0,021$) stärker als auf der Kollagenplatte. Bei Reduktion der Cis Konzentration um 50% können trotz steigender DTX-Konzentration immer noch aktive Tumorzellen ausgezählt werden. Bei der Beschichtung Laminin fällt auf, dass bei allen Konzentrationen eine 100%ige Tumorzellreduktion nach Einwirkung der beiden Zytos-

tatika erreicht wird. Ebenfalls wird unter Bestrahlung die Koloniereduktion bei 3,333 μM Cis verbessert; bei der Dosierung 3,333 μM Cis und 275 nM DTX sogar signifikant stärker ($p=0,021$) im Vergleich zur Beschichtung Kollagen bzw. im Vergleich zur Beschichtung hFN ($p=0,026$). Diese Kombination ist auch signifikant stärker koloniereduktiv auf der bestrahlten ECM-Platte im Vergleich zur nicht bestrahlten ECM-Platte ($p=0,010$) (Abb.25).

Bei der Auswertung der Mittelwerte (Tab.11) fällt die hohe Zellkolonieanzahl bei Kollagen im Kontrollmedium auf. Sie reduziert sich unter DTX und Cis in der jeweiligen Konzentration von 1 TPL auf 6%. Bei Reduktion der Konzentration findet eine entsprechend geringere Koloniereduktion statt.

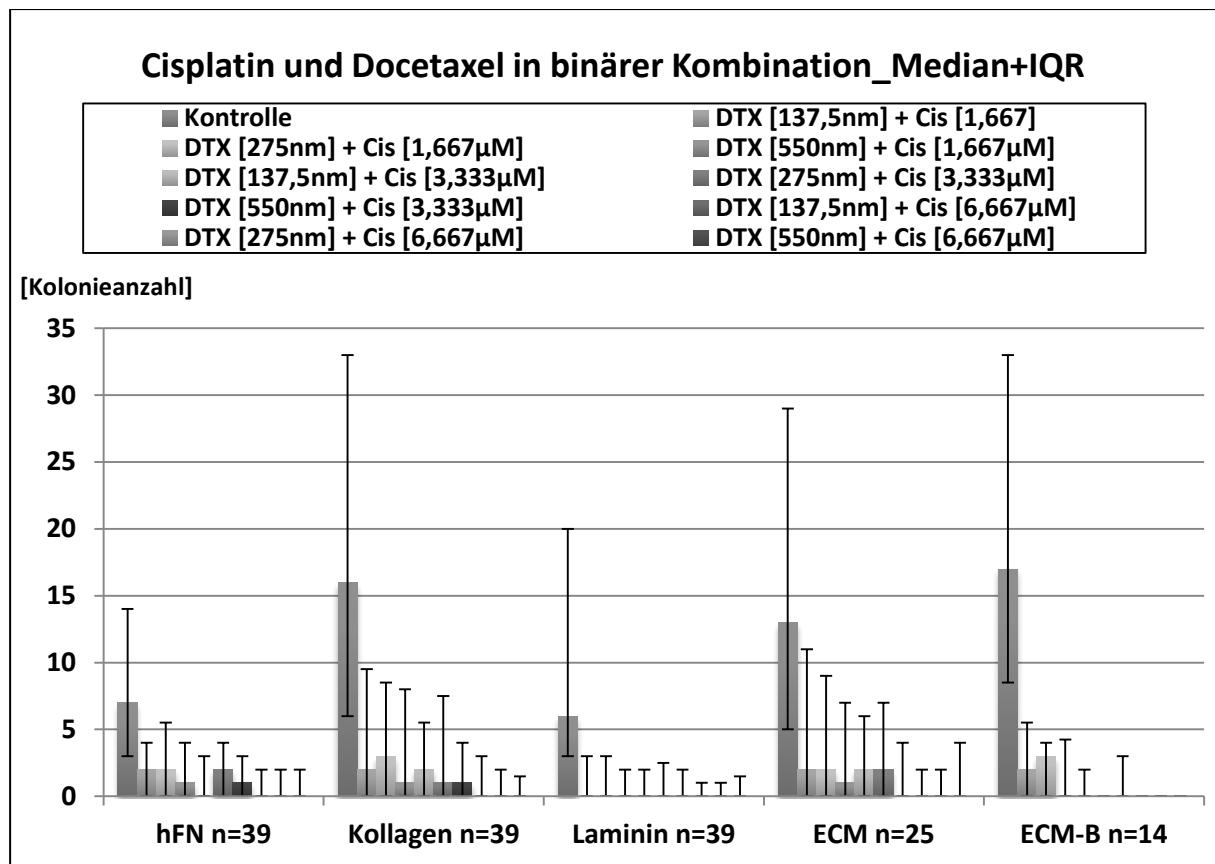


Abb.25 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cisplatin und Docetaxel in binärer Kombination

Tab.11 Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cisplatin und Docetaxel in binärer Kombination

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	hFN [n=39]	Kollagen [n=39]	Laminin [n=39]	ECM [n=25]	ECM_B [n=14]
Kontrolle	16,08	60,42	20,96	30,89	24,50
DTX (137,5 nM) + Cis (1,667 µM)	4,31	14,69	3,33	8,44	3,36
DTX (275 nM) + Cis (1,667 µM)	5,26	12,26	3,31	7,88	3,79
DTX (550 nM) + Cis (1,667 µM)	3,31	10,79	3,00	4,68	4,93
DTX (137,5 nM) + Cis (3,333 µM)	2,26	8,82	3,13	4,16	2,29
DTX (275 nM) + Cis (3,333 µM)	2,62	14,05	2,95	5,96	1,07
DTX (550 nM) + Cis (3,333 µM)	1,85	6,62	2,72	2,36	5,50
DTX (137,5 nM) + Cis (6,667 µM)	1,31	4,33	1,90	2,80	0,21
DTX (275 nM) + Cis (6,667 µM)	1,33	4,72	1,85	1,88	0,57
DTX (550 nM) + Cis (6,667 µM)	1,13	3,59	1,97	2,80	0,43

3.5.2 Cil und Cis

Die nur gering koloniereduktive Wirkung von Cil wird mit Cis in der Dosierung von 6,667 µM maximal verstärkt und führt zur fast vollständigen Reduktion der Koloniebildung. Wobei Cil und 6,667 µM Cis signifikant ($p=0,012$) koloniereduktiver auf HNSCC auf ECM beschichteten Platten mit Bestrahlung wirkt im Vergleich zu Kollagenplatten. Bei Reduktion der Dosis von Cis auf 3,333 µM und 1,667 µM zeigt sich die Wirkung entsprechend geringer. HNSCC auf ECM-Platten reagieren signifikant geringer auf die Kombination Cil und 1,667 µM Cis als HNSCC auf hFN beschichteten Platten ($p=0,045$). Unter Bestrahlung kommt es zu einer größeren Koloniereduktion vor allem bei der Dosierung von 1,667 µM Cis (Abb.26). Bei Betrachtung der Mittelwerte kann dieser Trend ebenfalls bestätigt werden (Tab.12).

Tab.12 Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cilengitide und Cisplatin in binärer Kombination

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	Kontrolle	10 µM Cilengitide + 1,667 µM Cisplatin	10 µM Cilengitide + 3,333 µM Cisplatin	10 µM Cilengitide + 6,667 µM Cisplatin
hFN [n=39]	16,08	2,40	1,27	1,28
Kollagen [n=39]	60,42	22,77	14,62	9,81
Laminin [n=39]	20,96	3,46	2,46	1,47
ECM [n=25]	30,89	11,44	5,84	2,32
ECM_B [n=14]	24,50	7,86	13,25	0,50

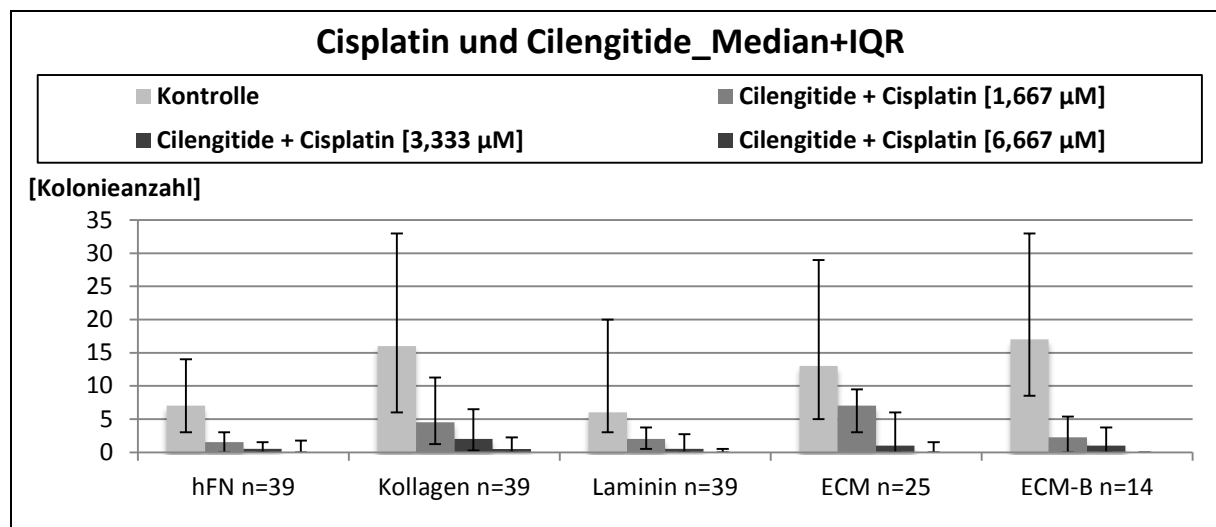


Abb.26 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy(ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cilengitide und Cisplatin in binärer Kombination

3.5.3 Cil und DTX

Aus der Abbildung 27 wird ersichtlich, dass HNSCC unter DTX und Cil auf der mit hFN und Laminin beschichteten Platten in allen Konzentrationen die fast gleiche Koloniereduktion aufzeigen. HNSCC auf ECM-Platten zeigen einen fast linearen Verlauf der Koloniereduktion bei steigender Dosis von DTX, wohingegen HNSCC auf Kollagenplatten bei der Dosierung von 550 nM DTX mit einem leichten Koloniewachstum reagieren (+13%). Erfolgt eine anschließende Bestrahlung zeigt die DTX-Dosierung 550 nM und 137,5 nM eine fast gleiche Koloniereduktion entgegen der Erwartung. Cil mit 137,5 nM DTX, 275 nM DTX bzw. 550 nM DTX wirkt bei HNSCC auf Laminin beschichteten Platten signifikant (DTX

(137,5 nM): $p=0,039$; DTX (275 nM): $p=0,022$; DTX (550 nM): $p=0,028$) koloniereduktiver als auf ECM beschichteten Platten. 550 nM DTX mit Cil wirkt ebenfalls koloniereduktiver bei HNSCC auf ECM-Platten im Vergleich zu Kollagenplatten ($p=0,027$). Die Koloniereduktion bei HNSCC ist bei allen Dosierungen von DTX mit Cil signifikant stärker auf der Beschichtungen ECM im Vergleich zu hFN (DTX (137,5 nM): $p=0,012$; DTX (275 nM): $p=0,010$; DTX (550 nM): $p=0,045$). Ebenfalls ist die Koloniereduktion in allen Dosierungen stärker auf der Beschichtung hFN im Vergleich zu Kollagen (DTX (137,5 nM): $p<0.001$; DTX (275 nM): $p<0.001$; DTX (550 nM): $p<0.001$) bzw. Laminin im Vergleich zu Kollagen (DTX (137,5 nM): $p<0.001$; DTX (275 nM): $p<0.001$; DTX (550 nM): $p<0.001$). DTX und Cil wirken signifikant koloniereduktiver auf der Beschichtung Laminin (DTX (137,5 nM): $p=0,012$; DTX (550 nM): $p=0,002$) bzw. hFN (DTX (137,5 nM): $p=0,003$; DTX (550 nM): $p=0,005$) im Vergleich zur bestrahlten ECM-Platte.

Ein ähnliches Verhalten ist auch aus den korrespondierenden Mittelwerten abzulesen (Tab.13).

Tab.13 Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cilengitide und Docetaxel in binärer Kombination

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	Kontrolle	10 μ M Cilengitide + 135,7 nM Docetaxel	10 μ M Cilengitide + 275 nM Docetaxel	10 μ M Cilengitide + 550 nM Docetaxel
hFN [n=39]	16,08	1,33	1,18	1,74
Kollagen [n=39]	60,42	26,40	20,92	20,22
Laminin [n=39]	20,96	2,00	1,65	0,95
ECM [n=25]	30,89	10,48	10,82	7,26
ECM_B [n=14]	24,50	16,82	7,39	6,64

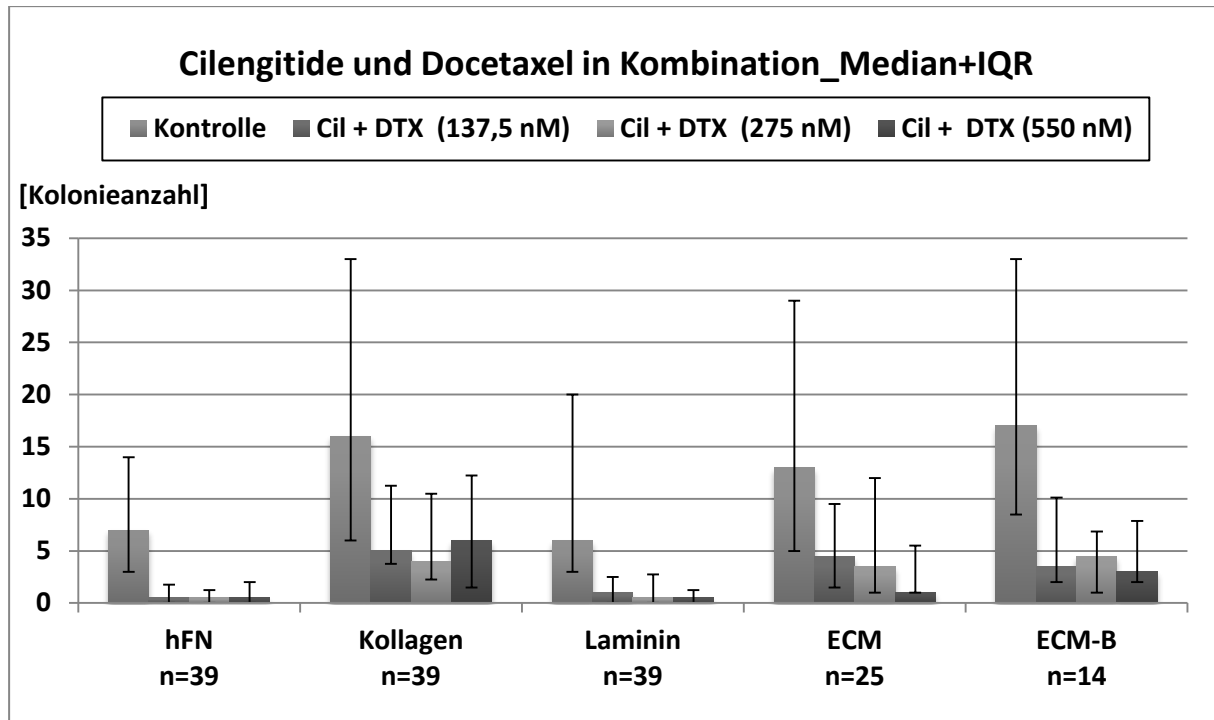


Abb.27 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cilengitide und Docetaxel in binärer Kombination

3.5.4 Cetux und DTX

Die Kombination von 66,6 µg/ml Cetux und DTX führt zu einer Verstärkung der Zytotoxizität von DTX; die Wirkung von Cis wird jedoch nicht erreicht. Die Abstufung zwischen 550 nM, 275 nM und 137,5 nM DTX zeigt einen linearen Anstieg der Koloniereduktion bei allen vier Beschichtungen. Bei der bestrahlten ECM-Platte ist jedoch die Toxizität von 275 nM DTX und 137,5 nM DTX identisch wie auch auf der Beschichtung mit hFN die Dosierungen mit 137,5 nM DTX und 275 nM DTX (Abb.28).

Signifikante Unterschiede in der Koloniereduktion von HNSCC bestehen auf der Beschichtung hFN. Hier sind signifikant ($p=0,040$) weniger HNSCC-Kolonien angewachsen als auf der Beschichtung Kollagen unter den beiden Chemotherapeutika. Die Beschichtung mit Laminin zeigt bei allen Dosierungen von DTX eine signifikant unterschiedliche Koloniereduktion im Vergleich zu der Beschichtung mit Kollagen ((DTX (137,5 nM): $p=0,026$; DTX (275 nM): $p=0,004$; DTX (550 nM): $p=0,014$). Die Mittelwerte zeigen ein uneinheitliches Bild. Auf den Beschichtungen hFN und Kollagen ist eine Zunahme der Kolonieanzahl bei 275 nM DTX in Kombination mit Cetux ersichtlich (Tab.14).

Tab.14 Mittelwert des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cetuximab und Docetaxel in binärer Kombination

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	Kontrolle	66,6 µg/ml Cetuximab + 137,5 nM Docetaxel	66,6 µg/ml Cetuximab + 275 nM Docetaxel	66,6 µg/ml Cetuximab + 550 nM Docetaxel
hFN [n=39]	16,08	5,12	5,04	4,06
Kollagen [n=39]	60,42	21,51	25,59	18,33
Laminin [n=39]	20,96	2,85	2,47	2,82
ECM [n=25]	30,89	12,26	8,12	11,94
ECM_B [n=14]	24,50	9,39	8,75	9,11

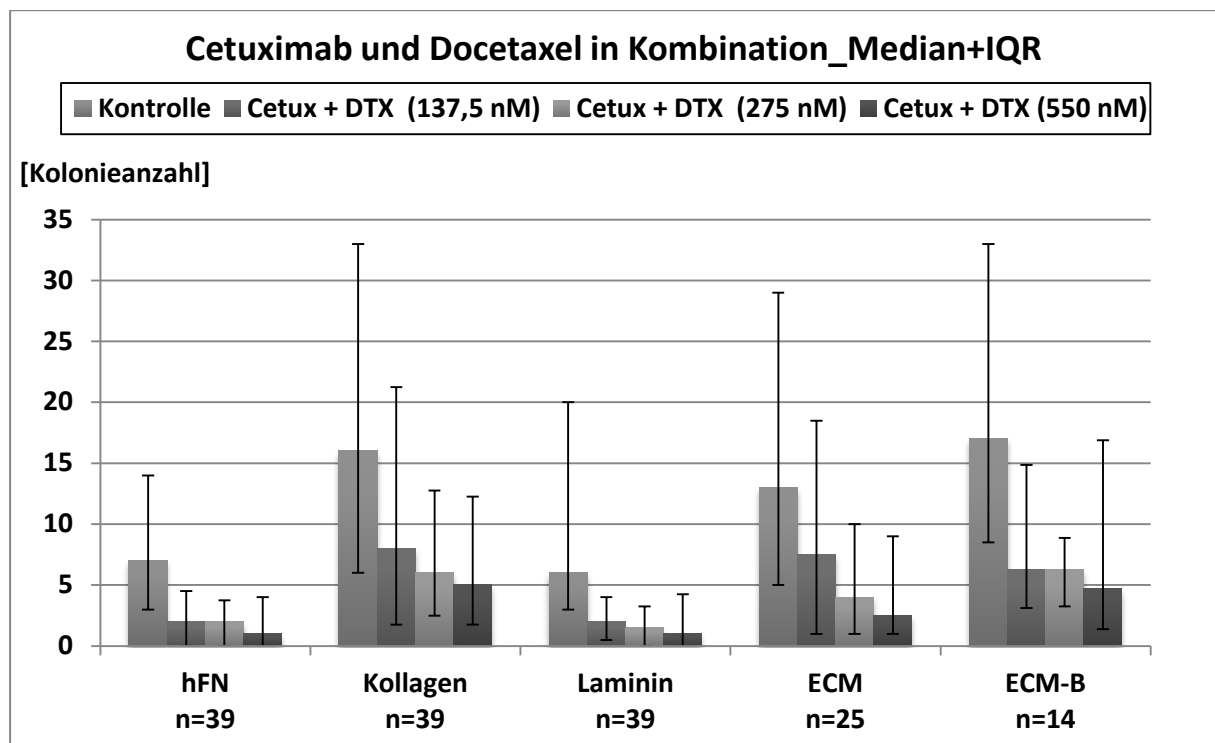


Abb.28 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy(ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cetuximab und Docetaxel in binärer Kombination

3.5.5 Cetux und Cis

Die hervorragende Wirkung von Cis erfährt in Kombination mit 66,6 µg/ml Cetux nur eine unwesentliche Verbesserung. Steigerbar ist diese Wirkung jedoch bei 3,333 µM Cis mit anschließender Bestrahlung. Der Grad der Koloniereduktion ist signifikant höher bei der Dosierung von 6,667 µM Cis ($p=0,033$) und 1,667 µM Cis ($p=0,027$) bei der bestrahlten ECM-

Platte im Vergleich zur hFN-Platte wie auch in der Dosierung von 3,333 μM Cis bei der Kollagenplatte im Vergleich zur hFN-Platte ($p=0,040$) (Abb.29).

Die Mittelwerte reagieren auf die Reduktion der Cis-Dosierung mit einem fast linearen Abfall der Koloniebildungsrate bei allen vier EZM-Proteinen inklusive anschließender Bestrahlung (Tab.15).

Tab.15 Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cetuximab und Cisplatin in binärer Kombination

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	Kontrolle	66,6 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab + 1,667 μM Cisplatin	66,6 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab + 3,333 μM Cisplatin	66,6 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab + 6,667 μM Cisplatin
hFN [n=39]	16,08	16,04	4,67	1,50
Kollagen [n=39]	60,42	17,24	12,04	3,40
Laminin [n=39]	20,96	8,18	2,14	1,08
ECM [n=25]	30,89	12,50	6,46	2,92
ECM_B [n=14]	24,50	6,29	3,57	1,00

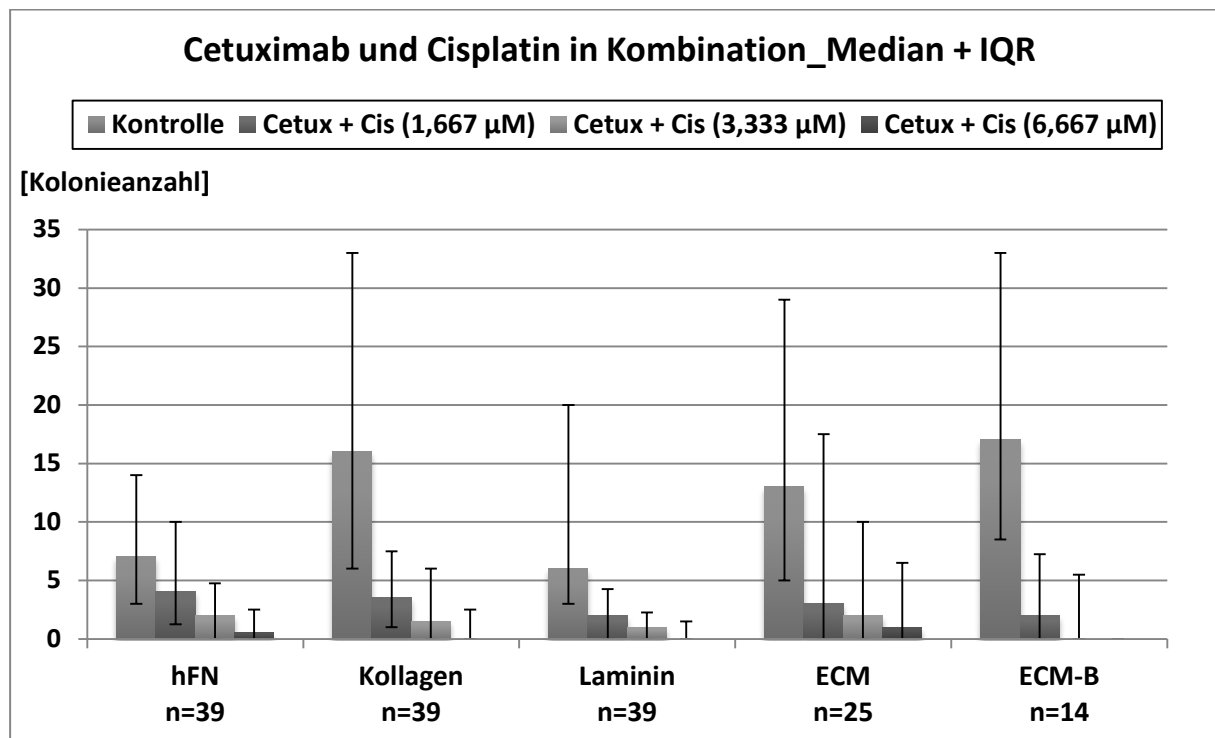


Abb.29 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cetuximab und Cisplatin in binärer Kombination

3.6 Einfluss der Zytostatika Cisplatin, Docetaxel, Cetuximab und Cilengitide auf das Koloniebildungsverhalten bei unterschiedlichen Konzentrationen in tertiärer Kombination

3.6.1 Cil, DTX und Cis

Die Kombination der drei Chemotherapeutika Cil, DTX und Cis zeigt sehr große Ähnlichkeit mit dem binären Verlauf von Cis und DTX. Das Hinzufügen von Cil bewirkt auf der Beschichtung hFN einen koloniereduktiven Mehrwert im Bereich von 3,333 μ M Cis. Auf der Beschichtung Kollagen zeigt die Dosierung von 550 nM DTX und 1,667 μ M Cis eine verminderte Koloniereduktion mit einer Zunahme der Koloniebildung um 17% im Vergleich zur DTX Dosis 275 nM. Die bestrahlten HNSCC zeigen ebenfalls eine deutlich erhöhte Koloniereduktion (Abb.30). HNSCC auf Laminin angewachsen zeigen eine signifikant ($p=0,015$) höhere Koloniereduktion unter Cil mit 550 nM DTX und 1,667 μ M Cis im Vergleich zu dem AnwachsmEDIUM ECM. HNSCC auf der Beschichtung Kollagen angewachsen zeigen mit Hilfe der Methode des FLAVINO-Assays bei mehreren Dosierungen von DTX und Cis mit Cil eine signifikant geringere Koloniereduktion im Vergleich zu den auf hFN angewachsenen HNSCC; nämlich bei Cil mit 275 nM DTX und 6,667 μ M Cis ($p=0,034$), bei Cil mit 275 nM DTX und 3,333 μ M Cis ($p=0,006$), bei Cil mit 550 nM DTX und 1,667 μ M Cis ($p=0,033$), bei Cil mit 275 nM DTX und 1,667 μ M Cis ($p=0,004$) und bei Cil mit 137,5 nM DTX und 1,667 μ M Cis ($p=0,007$). Ebenfalls reagieren HNSCC auf Kollagen angewachsen unter Einfluss der genannten Chemotherapeutika mit einer signifikant geringeren Koloniereduktionsrate als HNSCC auf Laminin angewachsen (Cil mit 275 nM DTX und 6,667 μ M Cis ($p=0,026$), Cil mit 550 nM DTX und 1,667 μ M Cis ($p<0,001$), Cil mit 275 nM DTX und 1,667 μ M Cis ($p=0,012$), Cil mit 137,5 nM DTX und 1,667 μ M Cis ($p<0,001$)). Zuletzt zeigen die auf Kollagen angewachsenen HNSCC signifikante Unterschiede im Koloniebildungsverhalten im Vergleich zu der bestrahlten ECM-Platte unter Einfluss der Chemotherapeutika Cil, Cis und DTX bei folgenden Kombinationen; Cil mit 550 nM DTX und 6,667 μ M Cis ($p=0,026$), Cil mit 550 nM DTX und 3,333 μ M Cis ($p=0,004$), Cil mit 137,5 nM DTX und 3,333 μ M Cis ($p=0,041$), Cil mit 550 nM DTX und 3,333 μ M Cis ($p=0,033$) und Cil mit 137,5 nM DTX und 1,667 μ M Cis ($p=0,012$). Die Mittelwerte zeigen eine kaum reduzierte Koloniereduktion nach Halbierung der DTX-Konzentration in Anwesenheit von Cis und Cil (Tab.16).

Tab.16 Mittelwerte des Koloniebildungsverhalten bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cilengitide, Docetaxel und Cisplatin in tertiärer Kombination

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	hFN [n=39]	Kollagen [n=39]	Laminin [n=39]	ECM [n=25]	ECM_B [n=14]
Kontrolle	16,08	60,42	20,96	30,89	24,5
Cil 10 µM + DTX (137,5 nM) + Cis (1,667 µM)	1,44	22,69	1,59	10,8	8,79
Cil 10 µM + DTX (275 nM) + Cis (1,667 µM)	1,56	21,92	1,59	8	14,5
Cil 10 µM + DTX (550 nM) + Cis (1,667 µM)	1,9	13,56	1,56	15,12	8,79
Cil 10 µM + DTX (137,5 nM) + Cis (3,333 µM)	1,08	17,13	1,56	5,12	4,57
Cil 10 µM + DTX (275 nM) + Cis (3,333 µM)	0,9	13,79	1,1	5,92	5,79
Cil 10 µM + DTX (550 nM) + Cis (3,333 µM)	1,05	13,05	1,31	7,64	6,64
Cil 10 µM + DTX (137,5 nM) + Cis (6,667 µM)	0,62	11,87	0,85	1,96	3,14
Cil 10 µM + DTX (275 nM) + Cis (6,667 µM)	0,9	6,36	0,64	2,4	2,79
Cil 10 µM + DTX (550 nM) + Cis (6,667 µM)	0,56	6,33	1,1	3,76	2,36

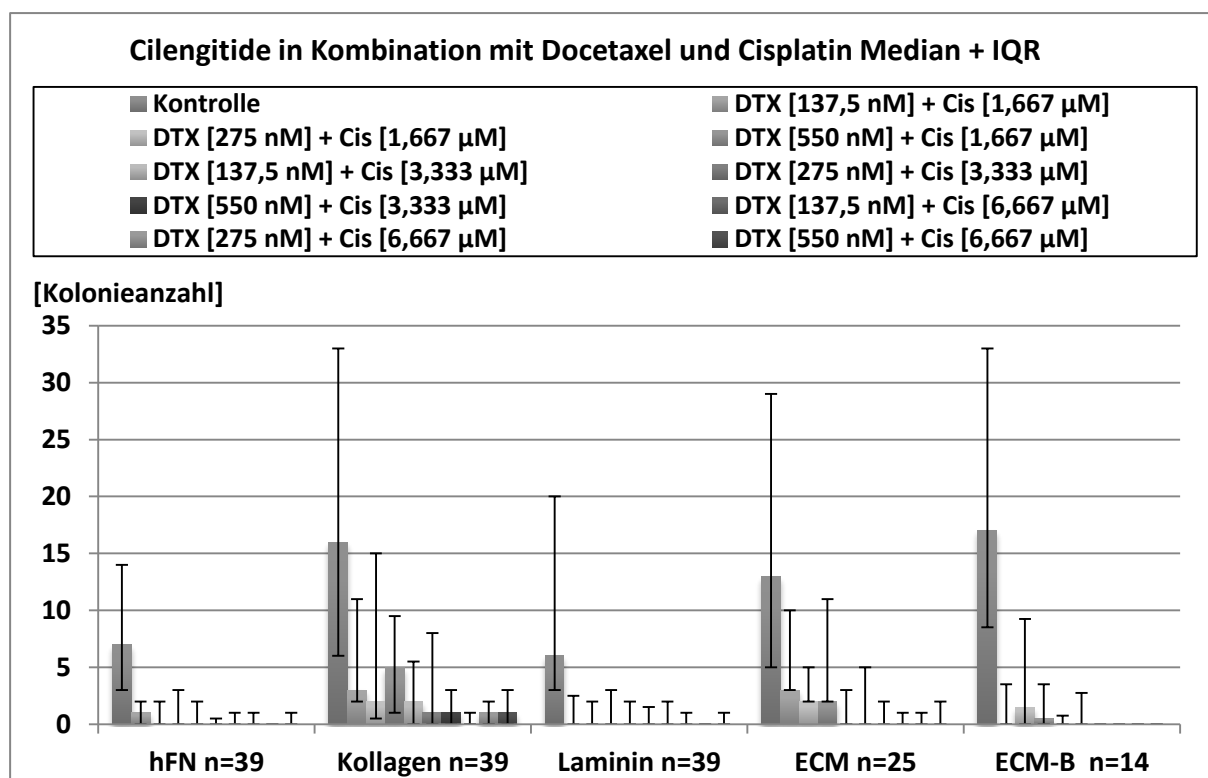


Abb.30 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cilengitide, Docetaxel und Cisplatin in tertiärer Kombination

3.6.2 Cil, Cetux und Cis

Die Abbildung 31 zeigt ein ähnliches koloniereduktives Verhalten wie die Kombination von 10 μM Cil und Cis. Das Hinzufügen von 66,6 $\mu\text{g/ml}$ Cetux erreicht auf allen Beschichtungen bei der Dosierung von 6,667 μM Cis eine komplette Reduktion der Koloniebildung, mit Ausnahme der ECM-Platte, die bei dieser Konzentration eine geringe Koloniebildung aufweist. Nach Bestrahlung erfolgt bei allen drei Konzentrationen von Cis (6,667 μM ; 3,333 μM ; 1,667 μM) eine komplette Koloniereduktion der Tumorzellen (Abb.31). HNSCC auf ECM-Platten angewachsen mit anschließender Bestrahlung zeigen eine signifikant ($p=0,004$) höhere Koloniereduktionsrate als HNSCC auf Kollagen angewachsen bei der Dosierung von Cil mit Cetux und 1,667 μM Cis. Die Mittelwerte zeigen generell eine gute koloniereduktive Wirkung von 6,667 μM Cis mit entsprechender Reduktion für 3,333 μM und 1,667 μM Cis. Auffällig ist, dass bei ECM-Beschichtung die koloniereduktive Wirkung mit Dosisreduktion (Cis 3,333 μM) sogar zunimmt (Tab.17).

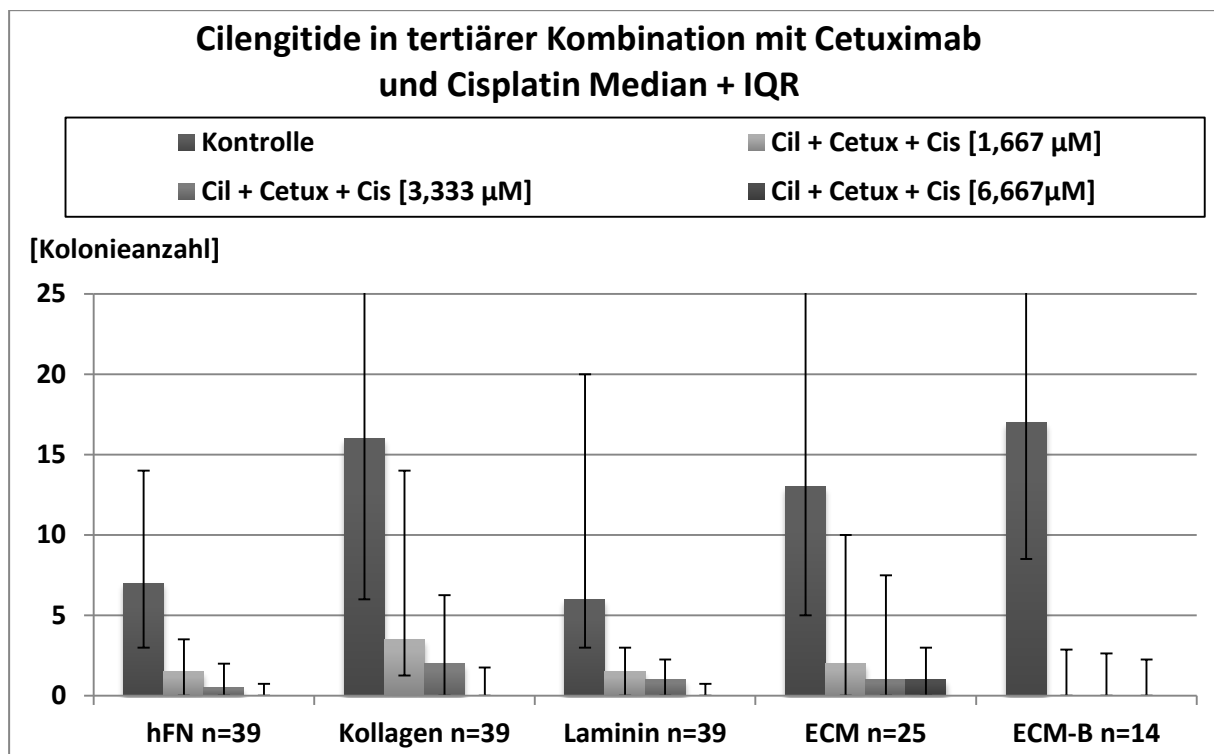


Abb.31 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cilengitide, Cetuximab und Cisplatin in tertiärer Kombination

Tab.17 Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cilengitide, Cetuximab und Cisplatin in tertiärer Kombination

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	Kontrolle	10 µM Cil + 66,6 µg/ml Cetux + 1,667 µM Cis	10 µM Cil + 66,6 µg/ml Cetux + 3,333 µM Cis	10 µM Cil + 66,6 µg/ml Cetux + 6,667 µM Cis
hFN [n=39]	16,08	2,28	1,27	1,09
Kollagen [n=39]	60,42	16,18	9,90	8,49
Laminin [n=39]	20,96	3,38	1,85	1,65
ECM [n=25]	30,89	5,42	4,34	4,88
ECM_B [n=14]	24,50	3,50	2,54	4,29

3.6.3 Cil, Cetux und DTX

Das Hinzufügen von 10 µM Cil in Kombination mit 66,6 µg/ml Cetux und DTX führt zu einer Verstärkung des koloniereduktiven Effektes vor allem auf den Beschichtungen Laminin und hFN. Wird die Dosis von DTX sogar auf 137,5 nM gesenkt, so kommt es bei Kollagen beschichteten Platten und ECM-Platten mit anschließender Bestrahlung sogar zu einer Reduktion der Koloniebildungsrate im Vergleich zu der Dosierung von 275 nM DTX (Abb.32). HNSCC auf Lamininbeschichtung reagieren auf die Dreierkombination von Cil, Cetux und DTX mit einer signifikanteren Koloniereduktion im Vergleich zu der ECM-Beschichtung bei den Dosierungen von 550 nM DTX ($p=0,005$) und 275 nM DTX ($p=0,002$). In ähnlicher Weise reagieren HNSCC auf hFN; hier zeigen HNSCC eine höhere Koloniereduktion auf hFN ebenfalls im Vergleich zur ECM-Beschichtung bei den Dosierungen von 550 nM DTX ($p=0,037$), 275 nM DTX ($p=0,041$) und 137,5 nM DTX ($p=0,041$). HNSCC auf bestrahlten ECM-Platten reagieren mit einer signifikant geringeren Koloniereduktionsrate bei der Dosierung von 275 nM DTX im Vergleich zur hFN Beschichtung ($p=0,009$) wie auch im Vergleich zur Lamininbeschichtung bei 550 nM DTX ($p=0,032$) und 275 nM DTX ($p<0,001$). Laminin hingegen zeigt eine signifikant größere Koloniereduktion von HNSCC bei der Dosierung 550 nM DTX ($p<0,001$), 275 nM DTX ($p<0,001$) und 137,5 nM DTX ($p<0,001$) im Vergleich zu Kollagen wie auch hFN im Vergleich zu Kollagen bei den Dosierungen 275 nM DTX ($p=0,005$) und 137,5 nM DTX ($p=0,004$).

Bei den Mittelwerten ergibt eine Dosisreduktion von 137,5 nM DTX auf im Vergleich zu 550 nM DTX eine ähnliche Koloniereduktion (Tab.18).

Tab.18 Mittelwerte des Koloniewachstums bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cilengitide, Cetuximab und Docetaxel in tertiärer Kombination

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	Kontrolle	Cilengitide + Cetuximab + 137,5 nM Docetaxel	Cilengitide + Cetuximab + 275 nM Docetaxel	Cilengitide + Cetuximab + 550 nM Docetaxel
hFN [n=39]	16,08	1,53	1,33	0,78
Kollagen [n=39]	60,42	26,00	30,40	20,73
Laminin [n=39]	20,96	1,40	0,87	0,83
ECM [n=25]	30,89	9,22	7,56	10,22
ECM_B [n=14]	24,50	5,46	5,96	5,21

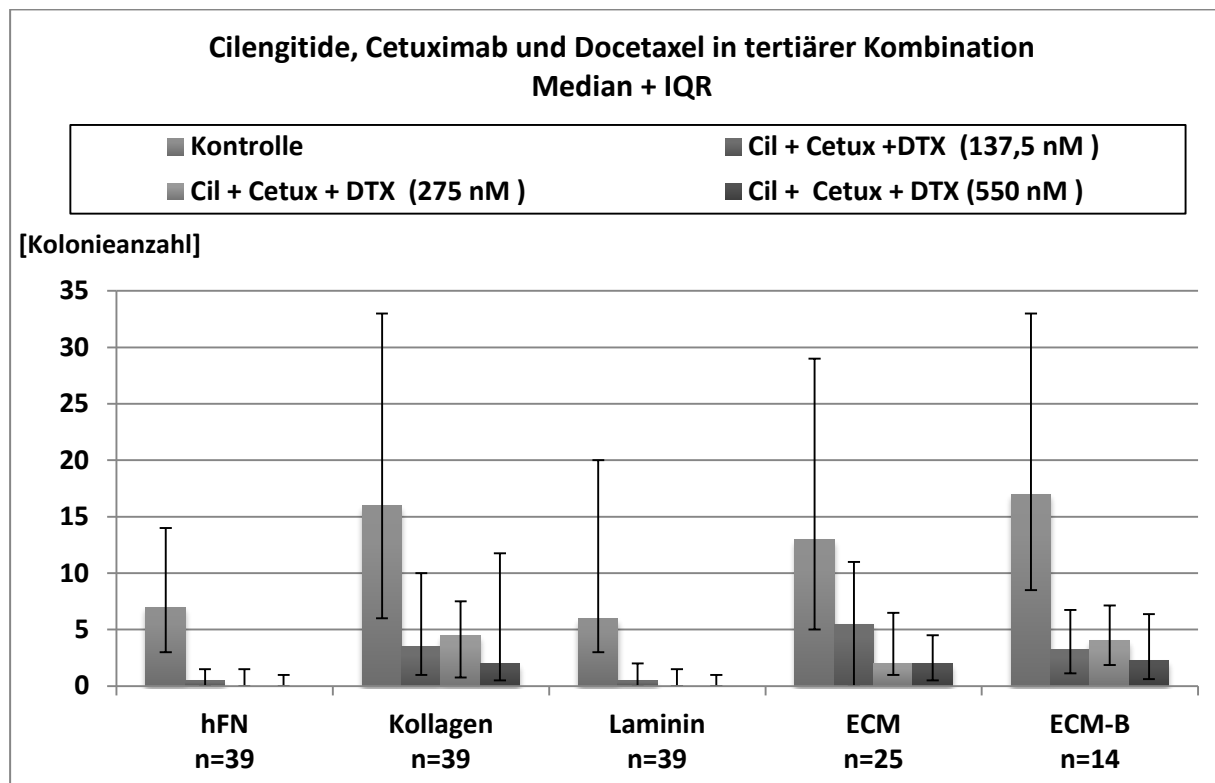


Abb.32 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cilengitide, Cetuximab und Docetaxel in tertiärer Kombination

3.6.4 Cis, Cetux und DTX

Beim Einsatz der drei Chemotherapeutika Cis, Cetux und DTX in unterschiedlicher Dosierung wird die hervorragende koloniereduktive Wirkung von Cis erneut herausgestellt.

Bei 6,667 μM Cis gibt es auch unter Reduktion der DTX-Konzentration gleichbleibend eine totale Koloniereduktion. Ähnliche Ergebnisse lassen sich erzielen bei 1,667 μM Cis und 550 nM DTX. Unter Bestrahlung kann ebenfalls der koloniereduktive Effekt gesteigert werden (Abb.33). HNSCC auf der Beschichtung Laminin angewachsen zeigen bei der Dosierung von 550 nM DTX und 1,667 μM Cis eine signifikant ($p=0,011$) höhere Koloniereduktion als HNSCC angewachsen auf der Beschichtung mit ECM. Wird die ECM-Platte bestrahlt so erzielt man bei der Dosierung von 137,5 nM DTX und 1,667 μM Cis eine signifikant ($p=0,021$) stärkere Koloniereduktion als bei der Beschichtung mit hFN. Die Koloniereduktion von HNSCC auf Laminin angewachsen ist signifikant höher bei der Dosierung von 137,5 nM DTX und 1,667 μM Cis ($p=0,021$) im Vergleich zu hFN und im Vergleich zu Kollagen ($p=0,003$). Ebenfalls zeigen HNSCC auf Kollagen angewachsen eine signifikant ($p=0,021$) geringere Koloniereduktion bei 137,5 nM DTX und 1,667 μM Cis im Vergleich zur Beschichtung Laminin. Der Verlauf der Mittelwerte bei der Kollagenbeschichtung zeigt, dass bei der Verwendung von 6,667 μM Cis eine Reduktion von DTX auf 137,5 nM zu einer deutlichen Verbesserung der koloniereduktiven Wirkung führt. Eine weitere Besonderheit sei angeführt; die Wirkung von 550 nM DTX und 6,667 μM Cis bei jeweils einer 1 TPL entspricht der Wirkung von 137,5 nM DTX und 3,333 μM Cis in Kombination mit Cetux (Tab.19).

Tab.19 Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung bei den Zytostatika Cisplatin, Cetuximab und Docetaxel in tertiärer Kombination

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	hFN [n=39]	Kol- lagen [n=39]	Lami- nin [n=39]	ECM [n=25]	ECM_B [n=14]
Kontrolle	16,08	60,42	20,96	30,89	24,50
Cetuximab + DTX (137,5 nM) + Cis (1,667 μM)	6,51	17,39	2,23	8,52	5,21
Cetuximab + DTX (275 nM) + Cis (1,667 μM)	5,72	15,74	1,90	11,52	3,29
Cetuximab + DTX (550 nM) + Cis (1,667 μM)	3,13	13,29	2,23	14,12	7,14
Cetuximab + DTX (137,5 nM) + Cis (3,333 μM)	3,85	10,46	1,33	4,44	2,57
Cetuximab + DTX (275 nM) + Cis (3,333 μM)	3,15	21,67	2,18	3,40	1,07
Cetuximab + DTX (550 nM) + Cis (3,333 μM)	5,05	19,56	1,10	6,72	2,00
Cetuximab + DTX (137,5 nM) + Cis (6,667 μM)	0,90	2,51	0,59	1,08	0,64
Cetuximab + DTX (275 nM) + Cis (6,667 μM)	1,13	4,82	0,67	1,92	0,21
Cetuximab + DTX (550 nM) + Cis (6,667 μM)	1,85	11,03	0,54	2,52	0,29

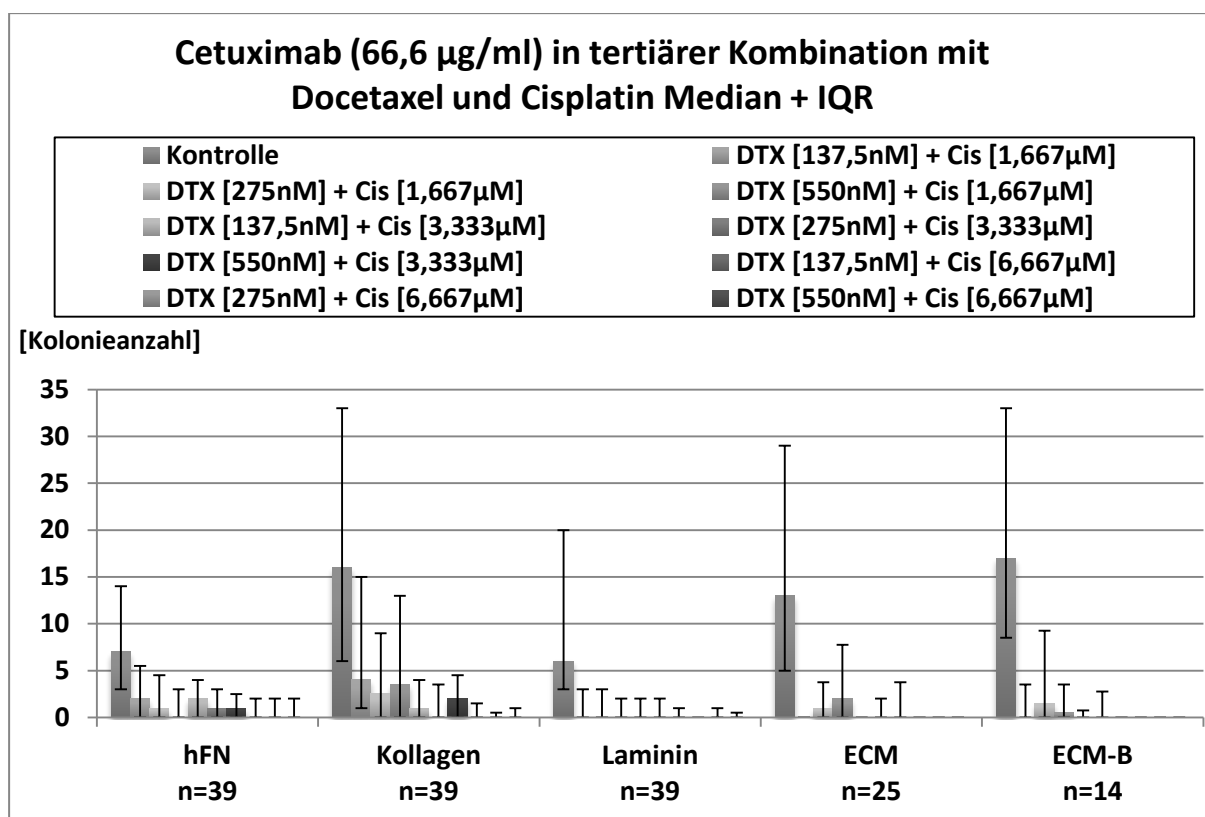


Abb.33 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cisplatin, Cetuximab und Docetaxel in tertiärer Kombination

3.7 Einfluss der Zytostatika Cisplatin, Docetaxel, Cetuximab und Cilengitide auf die Koloniebildung bei unterschiedlichen Konzentrationen in quartärer Kombination

3.7.1 Cil, Cis, Cetux und DTX

Die quartäre Kombination aus allen vier in der vorliegenden Studie verwendeten Chemotherapeutika zeigt generell auf allen Beschichtungen eine sehr gute Koloniereduktion. Nur auf Kollagen und ECM besteht bei 1,667 µM Cis eine geringe Koloniebildung. Nach Bestrahlung ist bei allen Dosierungen keine Koloniebildung mehr nachweisbar (Abb.34).

Die Koloniereduktion von HNSCC auf ECM-Platten angewachsen ist signifikant geringer bei den Dosierungen von 550 nM DTX und 1,667 µM Cis mit Cetux und Cil ($p=0,011$) und bei 137,5 nM DTX und 1,667 µM Cis mit Cetux und Cil ($p=0,023$) im Vergleich zu HNSCC auf Lamininplatten angewachsen. HNSCC auf Kollagenplatten angezüchtet zeigen eine signifikant geringere Koloniereduktion bei den Dosierungen 550 nM DTX und 3,333 µM Cis mit Cetux und Cil ($p=0,024$), 550 nM DTX und 1,667 µM Cis mit Cetux und Cil ($p=0,021$) und 137,5 nM DTX und 1,667 µM Cis mit Cetux und Cil ($p=0,003$) im Vergleich zu HNSCC auf Laminin angewachsen.

Bezüglich der Mittelwerte kann man nur bei der Beschichtung Kollagen einen eindeutigen Trend aussagen: 1,667 μM Cis hat gute die Koloniebildung unterdrückende Eigenschaften und reduziert die Koloniebildungsrate auf den Maximalwert von 97% bei einer DTX-Dosis von 275 nm. Wird die DTX-Konzentration erhöht oder reduziert resultieren steigende Koloniebildungsraten. Bei Reduktion der Cis-Konzentration auf 3,333 bzw. 1,667 μM erhöht sich die Anzahl gebildeter Kolonien (Tab.20).

Tab.20 Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cilengitide, Cisplatin, Cetuximab und Docetaxel in quartärer Kombination

Mittelwert Kolonieanzahl / Beschichtung	hFN [n=39]	Kol- lagen [n=39]	Laminin [n=39]	ECM [n=25]	ECM_B [n=14]
Kontrolle	16,08	60,42	20,96	30,89	24,50
Cil + Cetux + DTX (137,5nM) + Cis (1,667 μM)	2,23	13,15	1,82	4,68	4,14
Cil + Cetux + DTX (275nM) + Cis (1,667 μM)	1,72	11,21	1,54	5,12	2,07
Cil + Cetux + DTX (550nM) + Cis (1,667 μM)	1,77	9,03	1,15	6,48	2,86
Cil + Cetux + DTX (137,5nM) + Cis (3,333 μM)	1,33	8,92	1,15	3,76	1,21
Cil + Cetux + DTX (275nM) + Cis (3,333 μM)	1,03	8,46	0,85	2,64	1,14
Cil + Cetux + DTX (550nM) + Cis (3,333 μM)	1,15	13,26	0,69	4,08	1,29
Cil + Cetux + DTX (137,5nM) + Cis (6,667 μM)	1,00	2,69	1,00	2,72	0,93
Cil + Cetux + DTX (275nM) + Cis (6,667 μM)	0,92	1,82	0,49	3,84	2,29
Cil + Cetux + DTX (550nM) + Cis (6,667 μM)	0,90	3,69	0,72	2,48	1,00

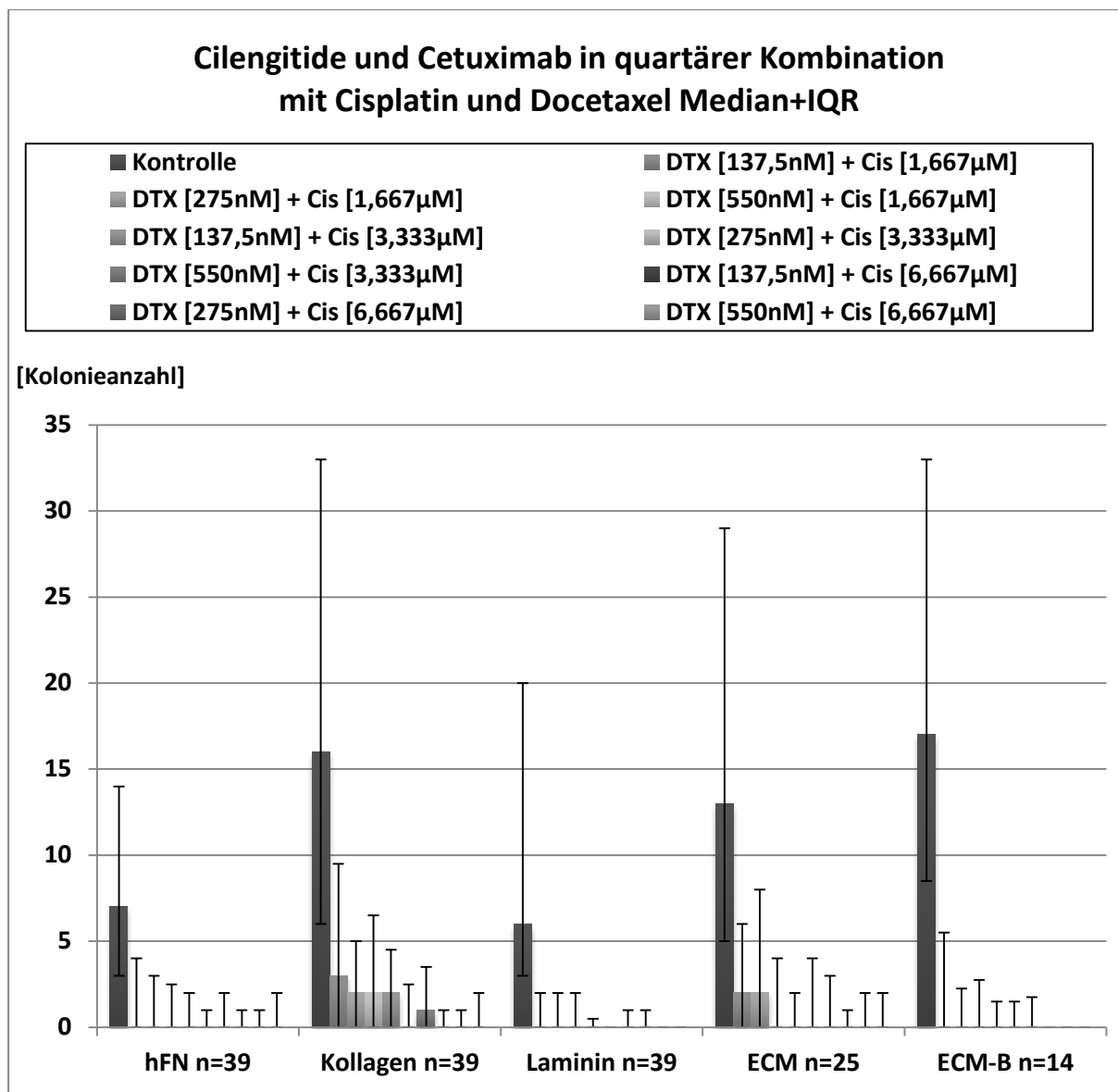


Abb.34 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cilengitide, Cisplatin, Cetuximab und Docetaxel in quartärer Kombination

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung der Chemotherapeutika Cil, DTX, Cis und Cetux an 100 Tumorproben von 92 Patienten mit Hilfe des patentierten FLAVINO-Assays untersucht. In 4.1.1. wird dargelegt, von welchen Einflüssen und unter welchen Bedingungen es zu einem Koloniewachstum kommt, eine Grundvoraussetzung für jegliche Chemoresponsetestung.

4.1 Chemoresponsetestung von HNSCC

4.1.1 Koloniebildungsverhalten von HNSCC

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 92 Patienten mit HNSCC eingeschlossen und deren Tumorzellen mit Hilfe des FLAVINO-Assays angezüchtet. Davon zeigten 39 Patienten ein positives Koloniebildungsverhalten (42%). Diese Patienten mit Koloniewachstum waren im Mittel rund 2,51 Jahre älter als ihre Vergleichsgruppe ohne Koloniewachstum. Unterteilt nach dem entsprechenden AJCC-Stadium konnte die Studie zeigen, dass vor allem Tumorproben der Stadien II (60%), I (50%) und IVA (39%) gute Koloniebildungsraten zeigten. Tumorproben mit dem histologischen Grading 2 wuchsen zu 43% der Fälle an und G3 Tumore noch zu 34%. Bezüglich der Risikoanamnese konnte die Studie zeigen, dass Tumorproben von Patienten ohne Alkoholkonsum zu 71% anwuchsen. Steigt der tägliche Alkoholkonsum auf 30 g bis 60 g, so halbiert sich die Koloniebildungsrate auf rund 35% und fällt bei einem täglichen Alkoholkonsum von über 60 g auf 31% ab. Anders hingegen gestaltet sich die Koloniebildungsrate bei Patienten mit regelmäßigem Zigarettenkonsum. Hier konnte interessanterweise gezeigt werden, dass Patienten mit einer Raucheranamnese von 20 bis 40 PY eine Koloniebildungsrate von 45% aufweisen, bei Nichtrauchern sogar 50%. HNSCC von Patienten mit bis zu 20 PY kommen nur auf eine Koloniebildungsrate von 21%. Folglich könnten der Verzicht auf Alkohol und ein Zigarettenkonsum von bis zu 40 PY zu guten Anwachsrate und bezüglich Chemoresponsetestung besser interpretierbaren Daten führen. Die ebenfalls auch von klinisch-epidemiologischen Studien her bekannte und für HNSCC mit einer schlechten Prognose vergesellschaftete Kombination von größeren täglich konsumierten Mengen Alkohol insbesondere gepaart mit langjährigem Zigarettenrauchen führt somit ebenfalls zu einer Verminderung der Anwachsrate und des Koloniebildungsverhaltens. Daher ist eine valide Bestimmung von Dosis-Wirkungsbeziehungen und Kombinationseffekten kaum möglich. Hervorzuheben ist ebenfalls, dass eine nicht vorhandene Koloniebildungsfähigkeit mit einer schlechteren Prognose des Patienten korreliert. Ein Grund hierfür ist eine vermehrt

gefundene Hypoxie im Tumorgewebe bei fortgeschrittenen HNSCC, die regulatorisch bedeutsam ist und beschriebener Maßen prognostisch ungünstig ist. Andererseits ist die Verknüpfung von zuvor unter hypoxischen Bedingungen adhärennten bzw. unter hypoxischen Bedingungen wachsenden Tumorzellen in normoxische Bedingungen für den Stoffwechsel dieser Zellen kritisch zu sehen und führt sicherlich zu verminderter Vitalität und Koloniebildungsvermögen von HNSCC. Dies gilt auch für Tumorzellen isoliert aus Metastasen. Unterteilt nach Tumorlokalisation zeigen Oropharynxkarzinome in rund 50% der Fälle ein Koloniewachstum. Die anderen Lokalisationen (Hypopharynx, Larynx und Mundhöhle) zeigen eine Koloniebildung von rund 33%.

4.1.2 Koloniezahl im Kontrollmedium bei unterschiedlichen Beschichtungen und Einzeitbestrahlung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig das Koloniebildungsverhalten von HNSCC auf beschichteten Mikrotiterplatten untersucht. Die Platten wurden mit folgenden Proteinen der extrazellulären Matrix beschichtet: humanes Fibronektin (hFN), humanes Laminin, Kollagen Typ I und eine Vielzahl von extrazellulären Matrixproteinen (ECM). Zusätzlich wurde der Einfluss einer Bestrahlung mit 2,2 Gy auf 14 ECM-Platten geprüft.

Die Untersuchungsergebnisse ermittelt mit dem Verfahren des FLAVINO - Assays gründen auf visuelle Ermittlung der Zunahme bzw. Reduktion der Koloniezahl in Abhängigkeit der Beschichtungen wie auch unter dem Einfluss der Chemotherapeutika 10 μ M Cil, 66,6 μ g/ml Cetux, DTX und Cis in unterschiedlichen Konzentrationen. Der Umstand, dass nur jeweils eine absolute Koloniezahl als Endprodukt ermittelt werden kann, ohne zuvor eine differente Darstellung der einzelnen abgelaufenen Einflüsse auf die Zellproliferation gewinnen zu können, lässt nur eine vage Vermutung über spezielle Vorgänge zu. Die Koloniebildung erfolgt via Adhärenzvorgänge der Tumorzellen an mit extrazellulären Matrixproteinen beschichteten Mikrotiterplatten. Damit gelingt es, neben der Proliferationsrate auch eine Aussage über die Kommunikation der Tumorzellen mit EZM- Proteinen und deren Interaktion mit Chemotherapeutika zu machen.

Somit konnte das Koloniebildungsverhalten bei fünf unterschiedlichen Gruppen differenziert werden. In der weiteren Diskussion der Ergebnisse finden ausschließlich die jeweiligen Mediane der Koloniezahl Berücksichtigung, womit „Ausreißer“ unberücksichtigt bleiben.

Die HNSCC wuchsen am besten auf der Kollagenbeschichtung (n=39) mit im Median 16 auszählbaren Kolonien an, wenn man die bestrahlten ECM-Platten mit 17 Kolonien im Median vernachlässigt. Gründe hierfür könnten in der besonderen Struktur des Kollagens Typ I liegen, die als Faserwerk mit Aufbau einer Tripelhelix wohl besonders gute Voraussetzungen für

die Adhärenz der Tumorzellen bietet. Die Beschichtung mit Kollagen zeigt ein besseres Koloniebildungsverhalten bei den Tumorstadien I, III und IVB. Tumore im Stadium II, IVA und IVC kamen hingegen auf ECM-Platten zu guten Koloniebildungsraten. Mit steigendem Tumorstadium und wohl auch erhöhter Entdifferenzierung der HNSCC erreicht die Mischung aus mehreren Extrazellulärmatrixproteinen auf der ECM-Platte eine höhere Koloniebildungsrate.

HNSCC von Patienten mit Alkoholabusus (30-60 g) zeigen eine gute Koloniebildung auf Kollagenplatten. Bei einem Alkoholgenuss von über 60 g täglich kommt es nach Einzeitbestrahlung sogar zu einem um 66% erhöhten Zellwachstum. Ein Zigarettenkonsum von mehr als 40 PY führt zu sehr guten Koloniebildungsraten auf Kollagenplatten. Nichtraucher und Patienten mit bis zu 20 PY zeigen ebenfalls auf der Kollagenbeschichtung gute Koloniebildungsraten. Tumorzellen von Patienten mit einem Zigarettenkonsum über 40 PY zeigen unter Bestrahlung einen Zuwachs der Koloniezahl von 65% gegenüber Tumorzellen die keiner Bestrahlung ausgesetzt waren. Somit kann man festhalten, dass Tumorzellen von Patienten mit einem Zigarettenkonsum über 40 PY und erhöhtem Alkoholgenuss unter Bestrahlung angeregt werden, mehr Kolonien zu bilden. Damit lässt sich auch hier nachweisen, dass Alkohol- und Zigarettenkonsum zu einem schnelleren Wachstum der HNSCC führt und damit auch die Aggressivität des Tumors erhöht.

Betrachtet man die Tumorlokalisation so finden sich wiederum auf Kollagen beschichteten Mikrotiterplatten gute Koloniebildungsraten bei Tumoren des Oropharynx, der Larynx- und der Mundhöhlenregion. Nur Hypopharynxkarzinome zeigen leicht bessere Koloniebildungsraten auf ECM-Platten (+ 20%). Eine deutliche Zellvermehrung um 70% unter Bestrahlung mit 2,2 Gy gibt es nur bei Karzinomen der Mundhöhle. Dieses Phänomen des Zellwachstums unter Bestrahlung ist als Repopulation bekannt. Laut Perez und Brady (2007) kamen schon Withers und Taylor (Withers & Taylor, 1992) nach umfangreichen experimentellen und klinischen Untersuchungen zu der Erkenntnis, dass eine beschleunigte Repopulation der Tumorzellen während einer fraktionierten Bestrahlung stattfindet und nach der vierten Bestrahlungswoche nachzuweisen ist. Erneute Untersuchungen von Bentzen et al. (Bentzen et al., 1990) und Thames et al. (Thames et al., 1981) und davon unabhängige Untersuchungen von Fowler (Fowler, 1991) ließen den Schluss zu, dass die Repopulation bereits früher in der Bestrahlungsserie auftritt. Erst experimentelle Untersuchungen zu diesem Thema von Schmidt-Ullrich et al. (Schmidt-Ullrich et al., 1999) konnten belegen, dass molekulare Prozesse über bestrahlungsinduzierte Aktivierung von Rezeptoren und Stimulation des Zellwachstums die Repopulation induzieren, welche sogar schon nach Applikation einer Einzeldosis von 2,2 Gy

stattfindet. Generell zeigen im Median die mit Kollagen beschichteten Platten durchweg die höchsten Koloniebildungsraten und sind für die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve bei den Chemotherapeutika von besonderer Relevanz. Im weiteren Verlauf der Diskussion wird die Koloniebildungsrate auf der Kollagenbeschichtung als Referenz herangezogen und mit der auf der Lamininbeschichtung verglichen, da diese die geringste Koloniebildungsrate im Median aufwies. Mit dieser Methode soll untersucht werden, ob die Verläufe der Koloniereduktion durch Chemotherapeutika bei den zwei unterschiedlichen Beschichtungen in Bezug auf die Koloniebildungsrate Ähnlichkeiten aufweisen.

4.1.3 Chemoresponsetestung Cil und Cetux

Cil kann, wie unter 3.3.1. dargestellt die Koloniebildung von HNSCC *ex vivo* unterdrücken. Die Effizienz ist dabei sowohl von den Patienteneigenschaften wie den experimentellen Rahmenbedingungen und dem zusammen mit Cil eingesetztem Chemotherapeutikum Cetux abhängig und wird nachfolgend diskutiert.

Cetux in seiner Rolle als EGFR-Inhibitor hemmt nachfolgende Signaltransduktionwege und somit das Wachstum bzw. Proliferation von HNSCC. Ebenfalls kann es auch durch eine induzierte Apoptose zur Zellzahlreduktion kommen, wenn bei EGFR-Blockade der Zelle lebenswichtige Signale fehlen oder eine Vernetzung der EGFR deren Recycling teilweise verhindert.

Cil in seiner Funktion als Integrininhibitor verhindert oder reduziert die Interaktion der Integrine mit der EZM und beeinflusst damit lebenswichtige Signalwege in den Zellen quantitativ und qualitativer Art, so dass kein Tumorstadium, keine Adhärenz und folglich auch keine Neoangiogenese mehr stattfinden kann. Dieses differente Verhalten von Cetux und Cil wird in Abb.35 deutlich, bei der die Interaktion von Cetux und Cil bezüglich der Koloniereduktion auf Laminin und Kollagen dargestellt ist. Eine spezifische Verhinderung der Interaktion mit bestimmten Integrinen von Cil führt zu einer geringeren Adhärenz der HNSCC auf Kollagen, aber zu einer noch stärkeren da wohl noch spezifischeren Verminderung der Koloniebildung auf Laminin (+ 43%). Dieser Effekt bei Laminin lässt sich unter Zugabe von Cetux nicht verstärken.

Konträr dazu resultiert eine additive Wirksamkeitserhöhung bei simultan auf HNSCC einwirkenden EGFR- und Integrin targets bezüglich Koloniebildungsverhalten.

Nach der Jin-Formel ist folgende Schlussfolgerung zu ziehen: bei Kombination von Cetux und Cil auf der Beschichtung Kollagen ist eine Addition des koloniereduktiven Effektes nachzuweisen ($q=0,869$), jedoch auf der Beschichtung Laminin besteht ein Antagonismus

($q=0,760$). (Abb.35). Offenbar führt eine unterschiedliche Beschichtung zur Reifung von HNSCC-Kolonien mit unterschiedlichen Eigenschaften.

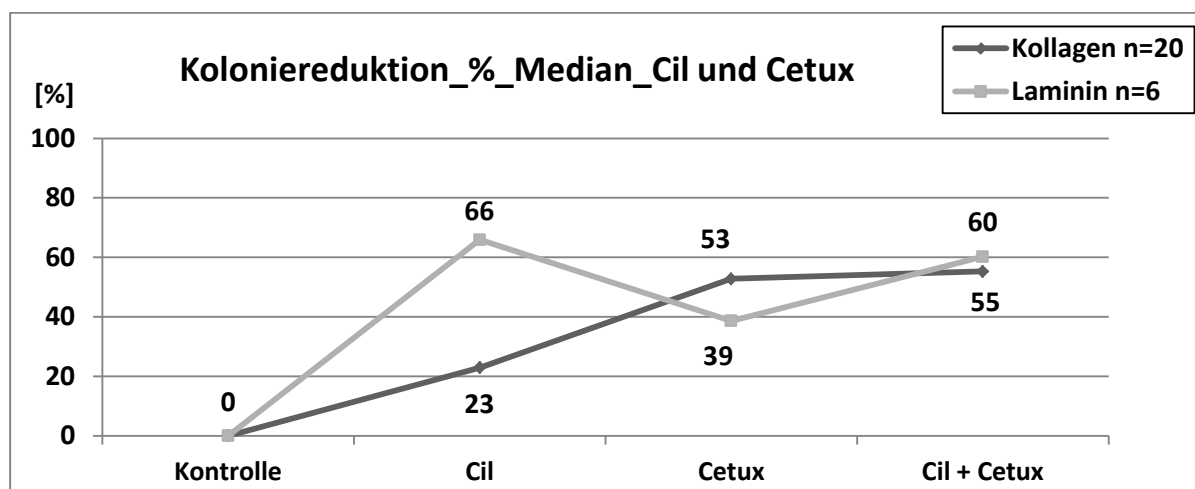


Abb.35 Darstellung der Koloniereduktionsrate in Prozent [%] auf den Beschichtungen Kollagen und Laminin im Median bei den Chemotherapeutika Cilengitide und Cetuximab und beide in Kombination

4.1.4 Chemoresponsetestung der Zytostatika Cis, DTX und in Kombination

Cis gilt als Standardchemotherapeutikum in der HNO-Tumorthherapie und bestätigt auch in der vorliegenden Studie an 92 Patienten ermittelt mit dem FLAVINO-Assay seine hervorragende koloniereduktive Wirkung auf HNSCC. So führt Cis in der Dosierung von 1 TPL zu einer fast vollständigen Tumorzellvernichtung (siehe 3.4.1.). DTX als Monotherapie kann diese hervorragende Wirkung nicht erzielen. Jedoch beide in Kombination ermöglichen bei einer jeweiligen Dosisreduktion ähnlich gute Werte wie in der Monotherapie bei 1 TPL (siehe 3.5.1.).

Die Koloniereduktion unter Einfluss der Chemotherapeutika Cis und DTX zeigt für die beiden Beschichtungen unterschiedliche Dosis-Wirkungskurven (Abb.36). Unter der Vorstellung, dass auf Kollagen und Laminin HNSCC unterschiedliche Wachstumsimpulse erhalten und die koloniereduktive Wirkung beider Zytostatika verschiedene Angriffsorte haben, wird die maximale Koloniereduktion bei der Kombination von jeweils 1 TPL der Substanzen 6,667 μM Cis und 550 nM DTX erreicht. Aus dem Verhalten der Koloniereduktion generell wird ersichtlich, dass Cis als DNA-Alkylanz die potentere Substanz ist und somit zu recht in der Erstlinientherapie bei HNSCC eingesetzt wird. Eine Dosisreduktion auf 3,333 μM Cis und 275 nM DTX führt bei beiden Substanzen zu einer vergleichbaren Verminderung der Koloniebildungsrate.

Laut der Jin-Formel wirken bezüglich der Koloniereduktion alle binären Konzentrationen mit DTX und Cis bei HNSCC auf Kollagen angezüchtet additiv. HNSCC auf Laminin angezücht-

tet zeigt überwiegend ebenfalls eine Additivität. Bei den Kombinationen 3,333 μM Cis mit 137,5 nM DTX bzw. 275 nM DTX, gelingt sogar der Nachweis eines Synergismus. Die Kombinationen 1,667 μM Cis mit 275 nM DTX bzw. 550 nM DTX, zeigen hingegen einen Antagonismus im binären Gebrauch der Chemotherapeutika (Tab.21). Auch hier scheint die unterschiedliche Beschichtung zum Anwachsen unterschiedlicher Zelltypen geführt zu haben (Abb.37).

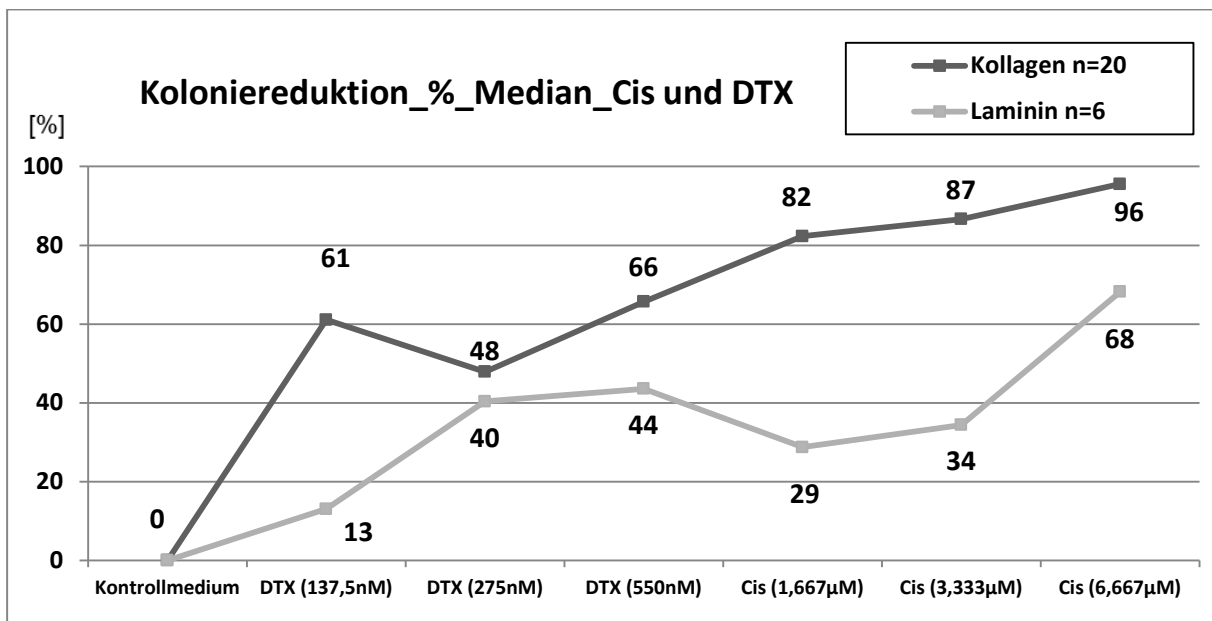


Abb.36 Darstellung der Koloniereduktionsrate in Prozent [%] auf den Beschichtungen Kollagen und Laminin im Median bei den Zytostatika Cisplatin und Docetaxel bei unterschiedlichen Dosierungen

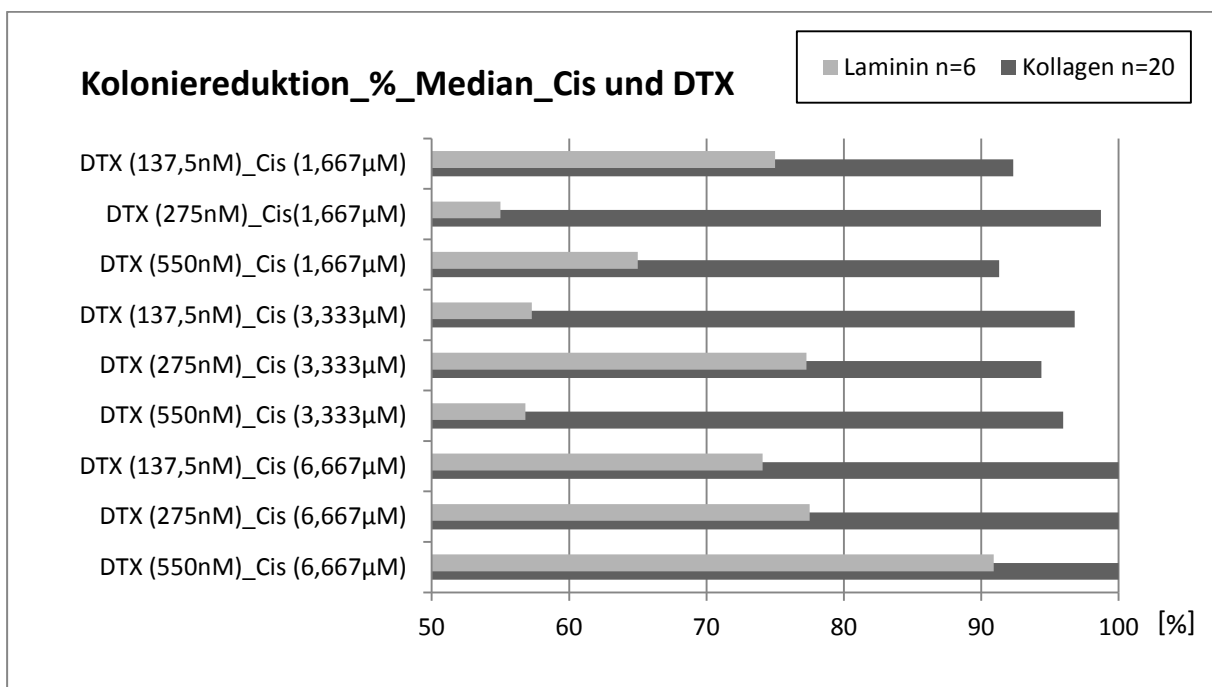


Abb.37 Darstellung der Koloniereduktionsrate in Prozent [%] auf den Beschichtungen Kollagen und Laminin im Median bei den Zytostatika Cisplatin und Docetaxel bei unterschiedlichen Dosierungen

Tab.21 Jin-Ergebnisse [q] für die binären Kombinationen von DTX und Cis jeweils für die Beschichtungen Laminin und Kollagen; Synergismus ($q > 1,15$), Additivität ($q = 0,85-1,15$), **Antagonismus** ($q < 0,85$)

Binäre Kombination Jin-Ergebnisse [q]/ Konzentration von DTX_Cis	Kollagen n=20	Laminin n=6
DTX(137,5nM)_Cis(1,667µM)	0,939	1,036
DTX(275nM)_Cis(1,667µM)	1,01	0,679
DTX(550nM)_Cis(1,667µM)	0,927	0,792
DTX(137,5nM)_Cis(3,333µM)	1,021	1,333
DTX(275nM)_Cis(3,333µM)	1,014	1,271
DTX(550nM)_Cis(3,333µM)	1,01	0,902
DTX(137,5nM)_Cis(6,667µM)	1,018	1,024
DTX(275nM)_Cis(6,667µM)	1,024	0,957
DTX(550nM)_Cis(6,667µM)	1,016	1,108

4.1.5 Cil, Cetux, Cis und DTX in tertiärer und quartärer Kombination in Bezug auf Koloniebildungsverhalten

In tertiärer und quartärer Kombination der in der vorliegenden Studie verwendeten Chemotherapeutika zeigt wiederum das DNA-Alkylanz Cis in maximaler Dosierung von 6,667 µM die beste Dosis-Wirkungsbilanz. In Kombination mit DTX, das an Mikrotubuli angreift, erreicht sogar die niedrige DTX-Konzentration (137,5 nM) in Kombination mit Cis eine gleich gute Reduktion der HNSCC-Koloniebildung auf Kollagenplatten. DTX als Mitosehemmer, der in den Zellzyklus eingreift und auf der anderen Seite Cis als DNA-Interkalator, der zu Strangabbrüchen und Querverknüpfungen führt und schlussendlich in der Apoptose endet, stellt zusammen eine wirksame Chemotherapeutikakombination dar. So kann durch Dosisreduktion von DTX bei maximaler Cis-Konzentration gleiche Reduktionswerte erzielt werden. In tertiärer Kombination mit Cetux, dem EGFR-Inhibitor, ist es sogar möglich bei mittlerer Dosierung von 275 nM DTX die Dosierung von Cis auf 3,333 µM zu reduzieren. Dies ist jedoch nur für die Kollagenbeschichtung gültig. Laminin zeigt in tertiärer Kombination von DTX, Cis und Cetux die geringste Koloniereduktionsrate (57%). HNSCC adhären unter Einfluss des EGFR-Inhibitors besser an dem Extrazellulär-Protein Laminin und verhin-

dern somit ein Absterben von Kolonien. Der Integrininhibitor Cil hingegen verhindert spezifischer die Adhärenz von Tumorzellen auf der Beschichtung Laminin als Cetux. In allen Kombinationen können mit Cil höhere Koloniereduktionsraten auf der Beschichtung mit Laminin erzielt werden als ohne Cil. In quartärer Kombination kann durch Hinzunahme von Cil und Cetux die Dosierung von DTX auf 275 nM und von Cis auf 3,333 μ M gesenkt werden, um eine komplette Koloniereduktion auf der Beschichtung Kollagen zu erreichen. Die sich addierende Wirkung der vier Chemotherapeutika durch Angriff an unterschiedlichen Punkten innerhalb des Zellzyklus und der Zellregulation macht eine Dosisreduzierung bei Hinzunahme von Cetux und Cil der meist mit starken Nebenwirkungen einhergehenden Chemotherapeutika Cis und DTX ohne Wirkungsverlust möglich (Abb.38).

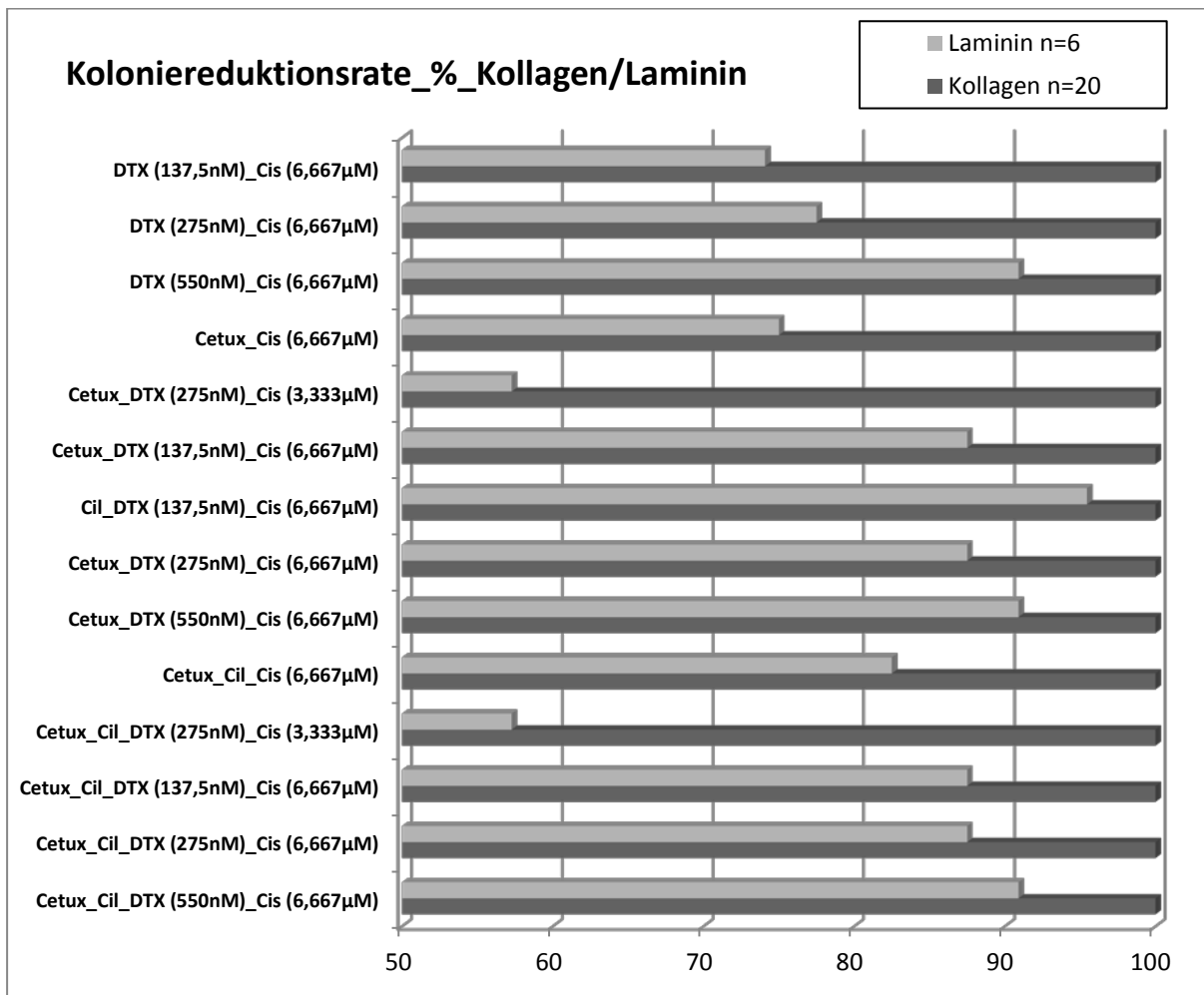


Abb.38 Übersicht der Chemoresponsetestung im Median (Koloniereduktionsrate in %) bei allen 4 Chemotherapeutika (Cil, Cetux, DTX und Cis) auf der Beschichtung Kollagen im Vergleich zur korrespondierenden Koloniereduktionsrate auf der Beschichtung mit Laminin

4.1.6 Vorteile von Cil in binärer, tertiärer und quartärer Kombination

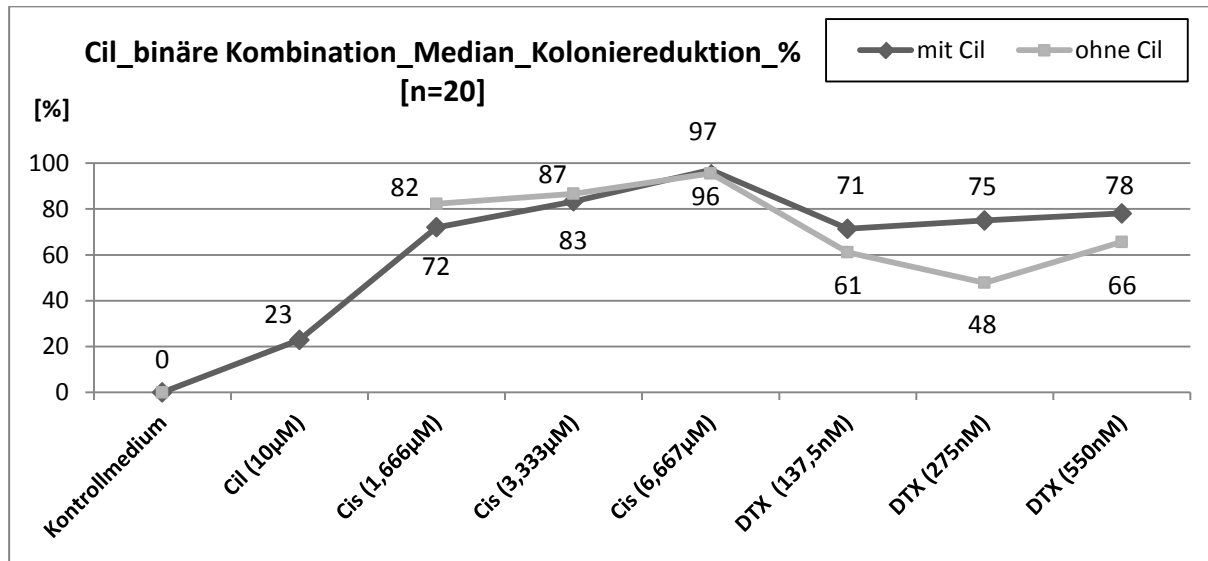


Abb.39 Vorteile bezüglich Koloniereduktionsrate von Cil in binärer Kombination mit Cis und DTX für HNSCC auf Kollagen angezüchtet (n=20)

Cil als Monotherapie bei HNSCC auf Kollagenplatten (n=20) angezüchtet erzielt nur eine geringe Koloniereduktionsrate von 23%. Wie schon zuvor erwähnt, stellt der Integrininhibitor kein Chemotherapeutikum zur Monoapplikation dar. Unter Hinzunahme des Platinderivates 1,667 µM Cis steigt die Koloniereduktionsrate um 49% an. Aber bei der Monotherapie mit Cis kann eine um 10% höhere Koloniereduktionsrate erzielt werden. Die Kombination von Cil und Cis ist daher nicht zu empfehlen.

Ganz anders verhält es sich mit DTX: hier erreicht die zusätzliche Gabe von Cil durchweg eine Verbesserung der Koloniereduktionsraten (DTX 275 nM (+ 27%); DTX 137,5 nM (+10%)). Taxane und Integrininhibitoren stören Zellzyklus und interne Stoffwechselvorgänge in bifunktioneller Art und Weise, sodass eine höhere Koloniereduktion von HNSCC auch bei geringerer Dosierung des oft mit starken Nebenwirkungen einhergehenden Taxans erzielt werden kann (Abb.39). Die Jin-Formel bestätigt die eben getätigten Aussagen, dass nämlich Cil mit 1,667 µM Cis gering antagonistisch wirkt, hingegen Cil mit 275 nM DTX synergistisch (Tab.22).

Tab.22 Jin-Ergebnisse [q] für die binären Kombinationen von Cil und Cis jeweils für die Beschichtung Kollagen; Synergismus ($q > 1,15$), Additivität ($q = 0,85-1,15$), Antagonismus ($q < 0,85$)

binäre Kombination/ Jin [q]	10 μ M Cil 1,667 μ M Cis	10 μ M Cil 3,333 μ M Cis	10 μ M Cil 6,667 μ M Cis	10 μ M Cil 137,5 nM DTX	10 μ M Cil 275 nM DTX	10 μ M Cil 550 nM DTX
Kollagen n=20	0,835	0,928	1,005	1,020	1,254	1,062

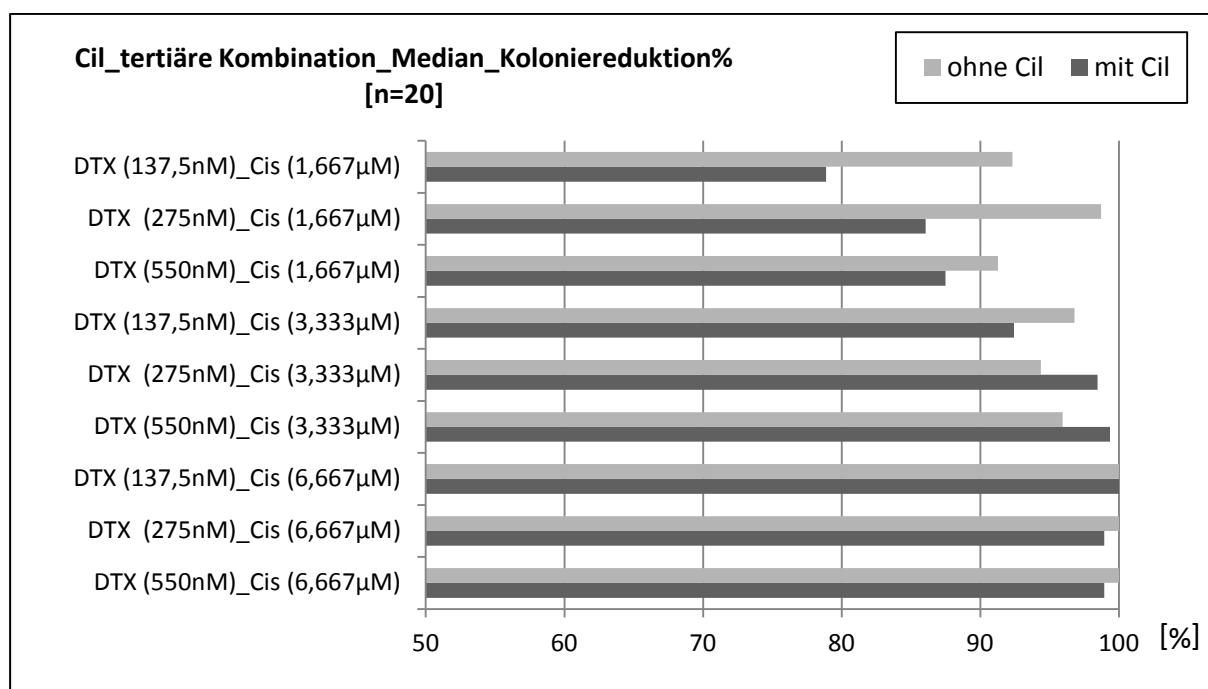


Abb.40 Vorteile von Cil bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in tertiärer Kombination mit Cis und DTX auf der Beschichtung Kollagen (n=20)

In tertiärer Kombination kann der Integrininhibitor Cil seine Wirkung nur in Kombination mit DTX (275nM und 550nM) bei halber Dosierung des DNA-Alkylanz Cis herausstellen. Diese additive Wirkung von Cil mit Cis und DTX wurde bereits in Tabelle 22 anhand der Jin-Formel verdeutlicht. Da diese drei Chemotherapeutika an verschiedenen Orten an der Zelle angreifen, kann eine hohe Koloniereduktionsrate erzielt werden. Alle anderen Kombinationen erreichen keine zusätzliche Koloniereduktion durch zusätzliche Gabe von Cil (Abb.40).

Aufschlussreich ist die quartäre Kombination von Cil mit Cetux, DTX und Cis dokumentiert; hier kann durch die zusätzliche Gabe von Cil in allen Kombinationen keine Steigerung der Koloniereduktion erzielt werden (Abb.41). Es kann vermutet werden, dass neben den differenten Angriffspunkten von DTX, Cis und Cetux keine zusätzliche vakante Stelle mehr für eine Wirkungsverstärkung von Cil vorhanden ist.

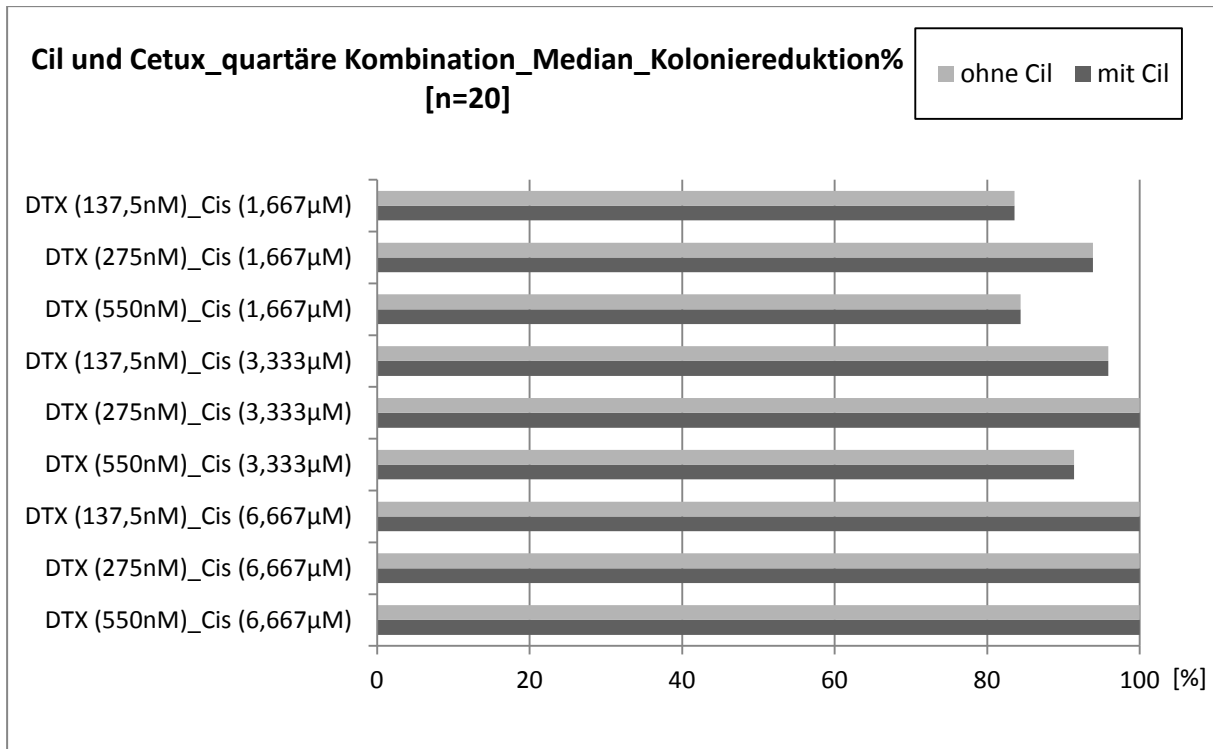


Abb.41 Vorteile von Cil bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in quartärer Kombination mit Cetux, Cis und DTX auf der Beschichtung Kollagen (n=20)

4.1.7 Vorteile von Cetux in binärer, tertiärer und quartärer Kombination

Ähnlich wie Cil verhält sich auch die Wirkung des EGFR-Inhibitors Cetux, das in Kombination mit Cis nur in der Dosierung 3,333 µM die gute koloniereduzierende Wirkung von Cis steigern kann (+8%). Anders verhält es sich hingegen in Kombination mit DTX: wird DTX in der Dosierung 275 nM verwendet, kann die zusätzliche Gabe von Cetux die koloniereduzierende Wirkung um 23% steigern (Abb.42). Auch hier wird nicht die maximale Dosierung von DTX benötigt. Bei mittlerer Dosierung von 275 nM DTX können EGFR-Inhibitoren spezifischer binden und somit die an sich durchschnittliche Wirkung (53% Koloniereduktionsrate) von Cetux als Monosubstanz verstärken.

Laut der Jin-Formel wirken beide Chemotherapeutika mit Cetux additiv bis auf die Kombination mit 137,5 nM DTX, welche leicht antagonistisch mit Cetux wirkt (Tab.23).

Tab.23 Jin-Ergebnisse [q] für die binäre Kombination von Cetux und Cis jeweils für die Beschichtung Kollagen; Synergismus ($q > 1,15$), Additivität ($q = 0,85 - 1,15$), Antagonismus ($q < 0,85$)

Binäre Kombination Jin [q]	Cetux_+ 1,667 μ M Cis	Cetux_+ 3,333 μ M Cis	Cetux_+ 6,667 μ M Cis	Cetux_+ 137,5nM DTX	Cetux_+ 275nM DTX	Cetux_+ 550nM DTX
Kollagen n=20	0,901	1,015	1,012	0,833	0,943	0,895

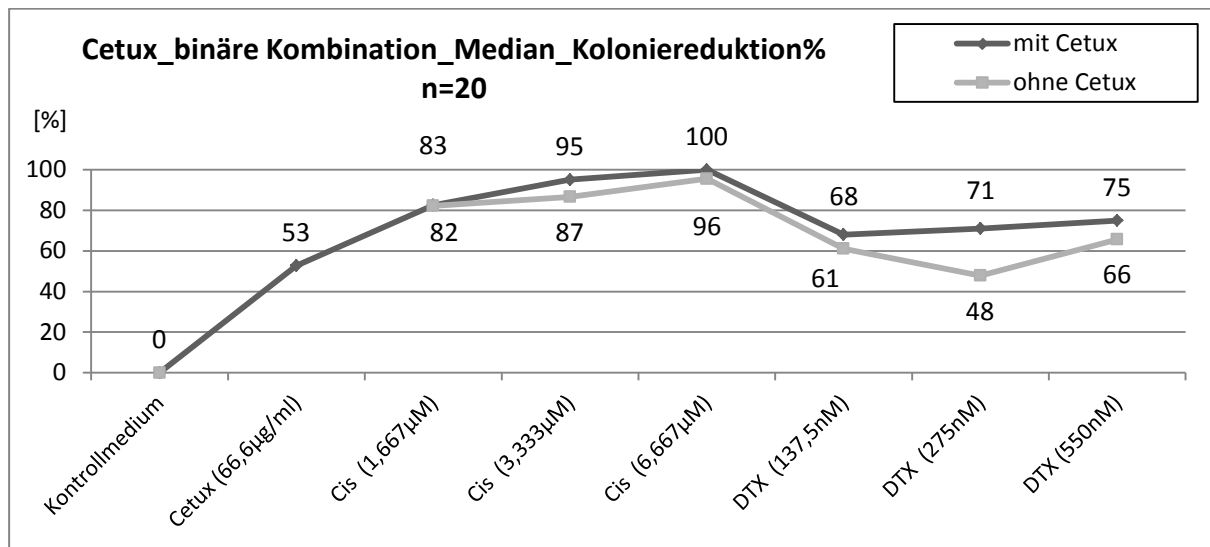


Abb.42 Vorteile von Cetux bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in binärer Kombination mit Cis oder DTX auf der Beschichtung Kollagen (n=20)

In der tertiären Kombination von Cetux mit Cis und DTX bringt die Gabe von Cetux bei der Dosierung von 6,667 μ M Cis keinen Vorteil. Eine leichte Verbesserung der Koloniereduktionsrate kann Cetux in der tertiären Kombination nur bei DTX in der Verwendung 275 nM bei 3,333 μ M Cis verzeichnen (+6%). Alle anderen Kombinationen profitieren nicht von der tertiären Kombination mit dem Antikörpers Cetux (Abb.43).

Wie bereits in Tabelle 21 erläutert wirkt die Verbindung 275 nM DTX und 3,333 μ M Cis synergistisch. Diese synergistische Wirkung wird durch Cetux gering verstärkt.

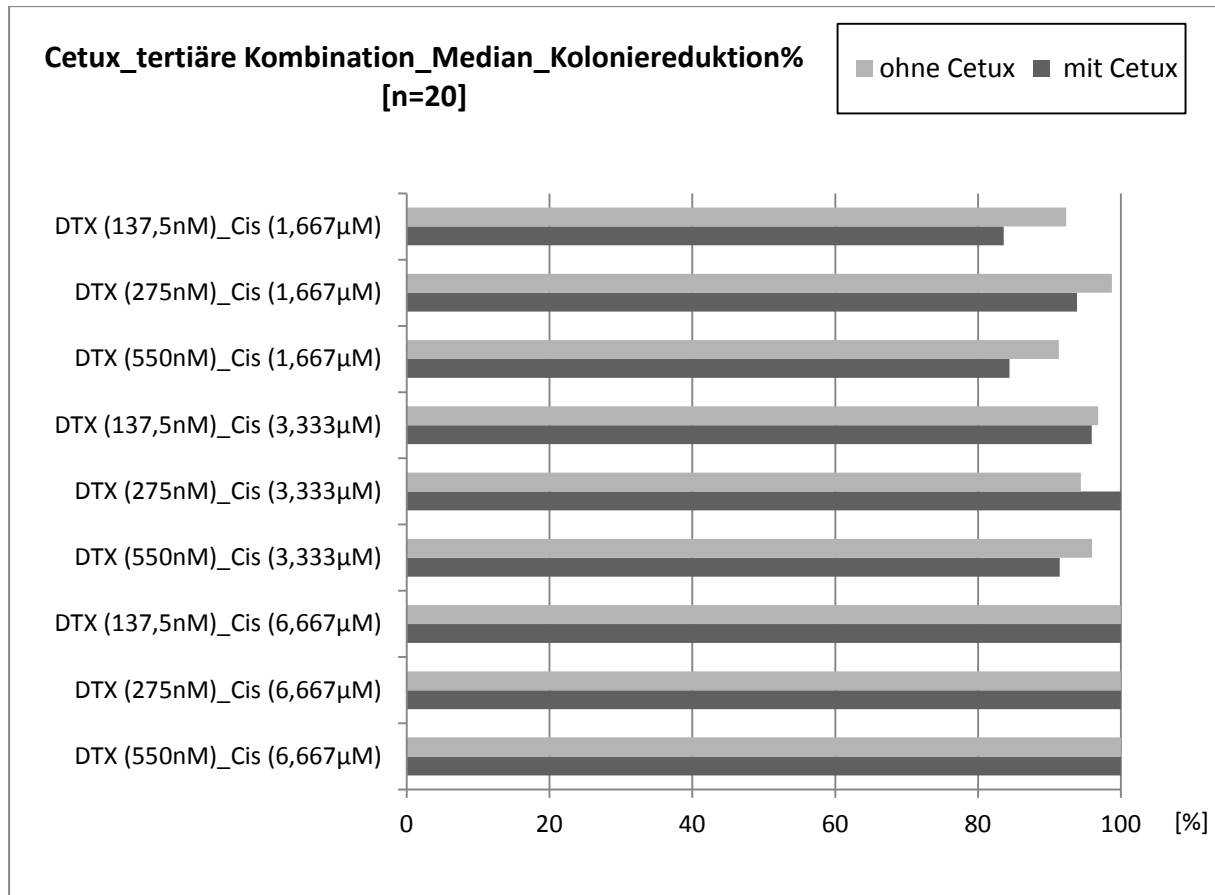


Abb.43 Vorteile von Cetux bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in tertiärer Kombination mit Cis und DTX auf der Beschichtung Kollagen (n=20)

In der quartären Kombination von Cetux mit Cil, Cis und DTX ergeben sich nur geringe Vorteile bei der zusätzlichen Gabe von Cetux. In der Verwendung von 275 nM DTX und 1,667 µM Cis kann die Gabe von Cetux die koloniereduktive Wirkung um 8% steigern und stellt somit die maximale Steigerungsrate durch Hinzugabe von Cetux dar (Abb.44). Als Begründung kann hier wieder wie auch bei Cil angeführt werden, dass durch die 4-er-Kombination keine vakanten Targets mehr für die einzelnen Chemotherapeutika gefunden werden können und somit insgesamt keine weitere Steigerung der Koloniereduktionsrate mehr erzielt werden kann.

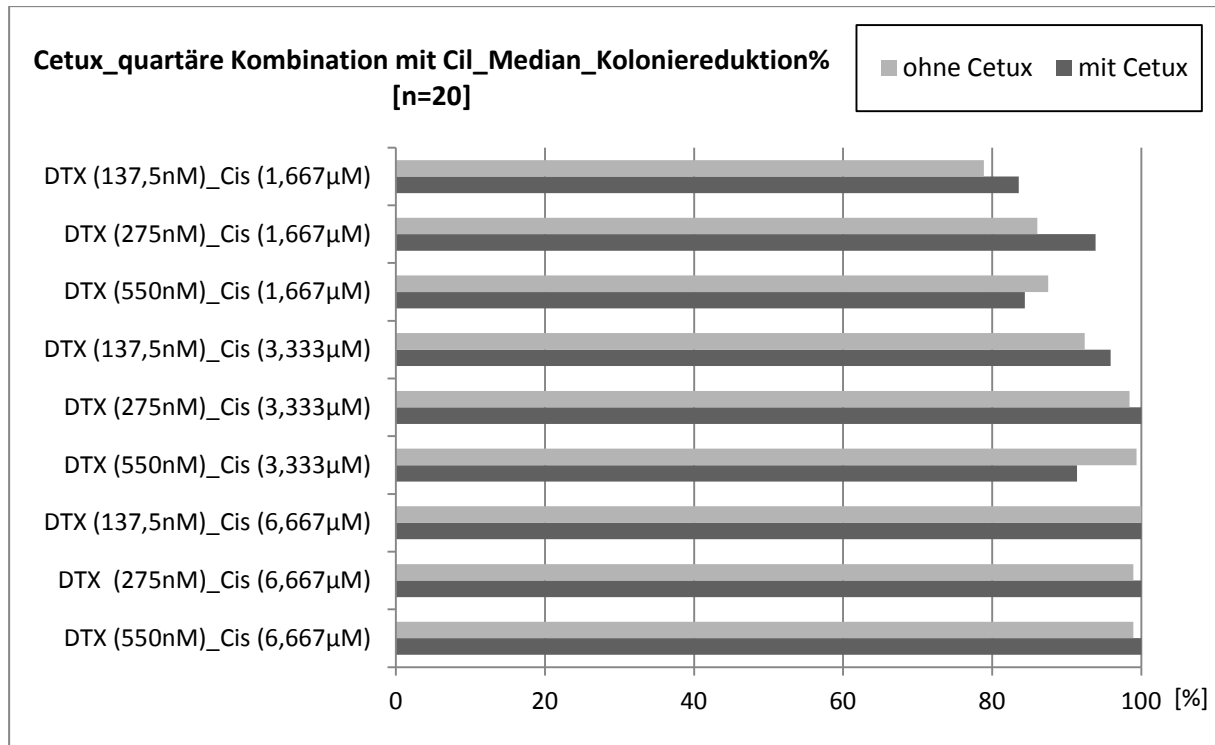


Abb.44 Vorteile von Cetux bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in quartärer Kombination mit Cil, Cis und DTX auf der Beschichtung Kollagen (n=20)

4.1.8 Wirkung der Chemotherapie bei zusätzlicher Bestrahlung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer zusätzlichen Einzeitbestrahlung mit 2,2 Gy bezüglich Koloniereduktionsverhalten bei unterschiedlichen Chemotherapeutika auf HNSCC bei ECM-Platten (n=14) untersucht und mit dem Koloniereduktionsverhalten von HNSCC bei unbestrahlten ECM-Platten (n=10) verglichen. Wird Cis in halber Dosierung, also 3,333 µM verwendet, kann eine zusätzliche Bestrahlung die Koloniereduktionsrate um 30% steigern. Bei allen anderen Dosierungen von Cis bzw. DTX ist die Wirkung geringer ausgeprägt ($\leq 11\%$). Bei 275 nM DTX reduziert sich sogar der koloniereduktive Einfluss auf HNSCC unter zusätzlicher Bestrahlung um 18%. Ähnliches Verhalten resultiert bei 1,667 µM Cis mit einer Reduktion von 9%. Das bereits sehr gute koloniereduktive Verhalten von Cis in der Monotherapie mit 6,667 µM kann durch eine Bestrahlung bis auf 100% gesteigert werden (Abb.45). In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Einzeitbestrahlung zu einer Vermehrung der HNSCC führt (siehe 4.1.2.). Die simultane Radiochemotherapie mit Cis führt in der Dosierung 6,667 µM zu einer vollständigen Koloniereduktion, bei Halbierung der Cis-Dosis (3,333 µM) nimmt die Reduktionsrate nur um 4% ab. Somit kann man Cis als guten Radiosensitizer ansehen.

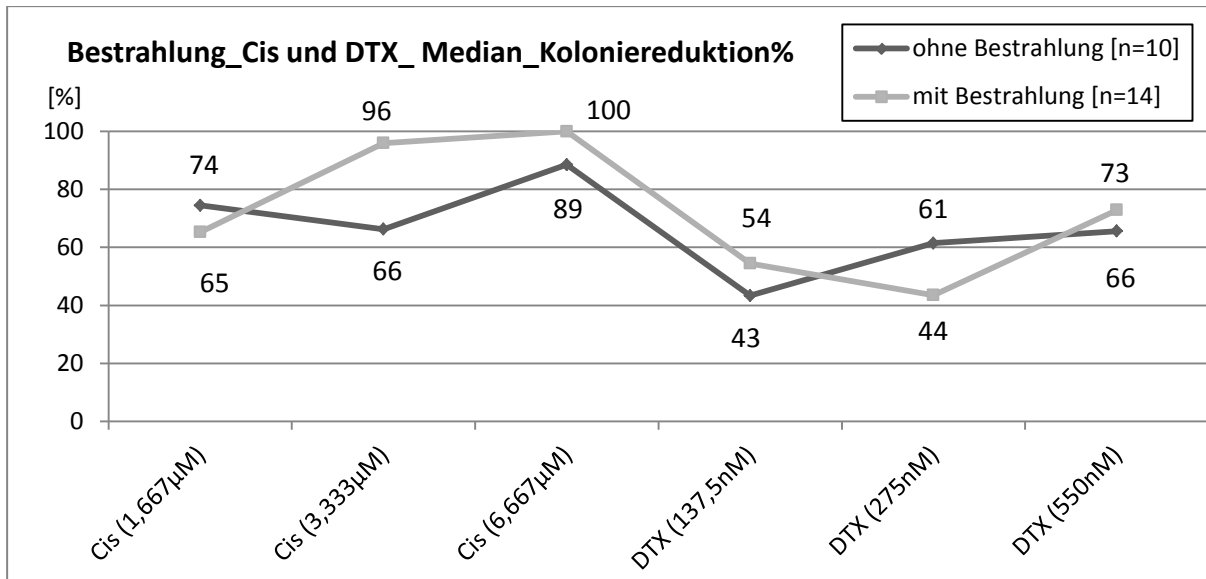


Abb.45 Vorteile einer Bestrahlung bezüglich Koloniereduktionsrate in Kombination mit den Chemotherapeutika Cis oder DTX in den Dosierungen 1, $\frac{1}{2}$ und $\frac{1}{4}$ TPL

Die koloniereduktive Wirkung von Cil in Kombination mit Cis auf HNSCC kann durch eine zusätzliche Bestrahlung bei der Dosierung 3,333 µM Cis und 1,667 µM Cis nochmals um rund 20% gesteigert werden. Cil in Kombination mit 275 nM DTX kann mit Hilfe einer Einzelzeitbestrahlung ein Plus an Koloniereduktion um rund 17% erzielen. Interessanterweise kann Cil mit anschließender Bestrahlung das Koloniebildungsverhalten um 15% besser unterdrücken als ohne Bestrahlung und bestätigt somit seine Position als Radiosensitizer (Abb.46).

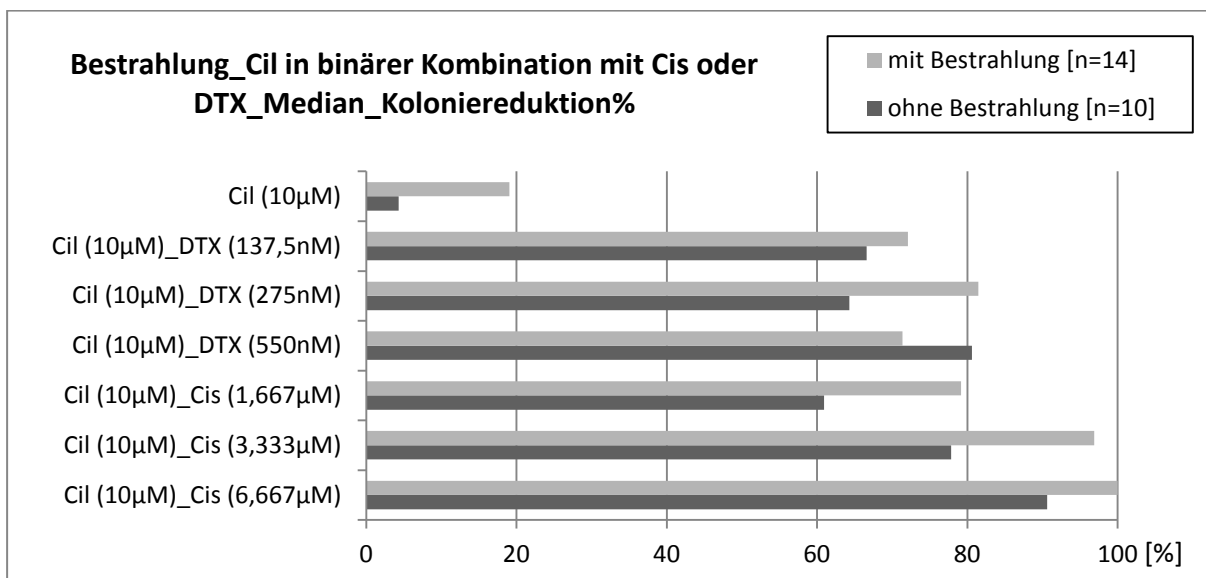


Abb.46 Vorteile einer Bestrahlung bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Cil in binärer Kombination mit Cis oder DTX in den Dosierungen 1, $\frac{1}{2}$ und $\frac{1}{4}$ TPL

Wird Cil tertiär kombiniert mit Cetux und Cis bzw. DTX kann ebenfalls das koloniereduktive Verhalten durch eine zusätzliche Bestrahlung verbessern. Bei einer Dosisreduktion von Cis bzw. DTX bis auf $\frac{1}{4}$ der Dosis kann eine zusätzliche Bestrahlung die Koloniereduktion im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie um 20% steigern. Jedoch bei binärer Kombination von Cil und Cetux ist eine zusätzliche Bestrahlung nicht von Vorteil und erzielt ein um 5% geringere Koloniereduktion (Abb.47).

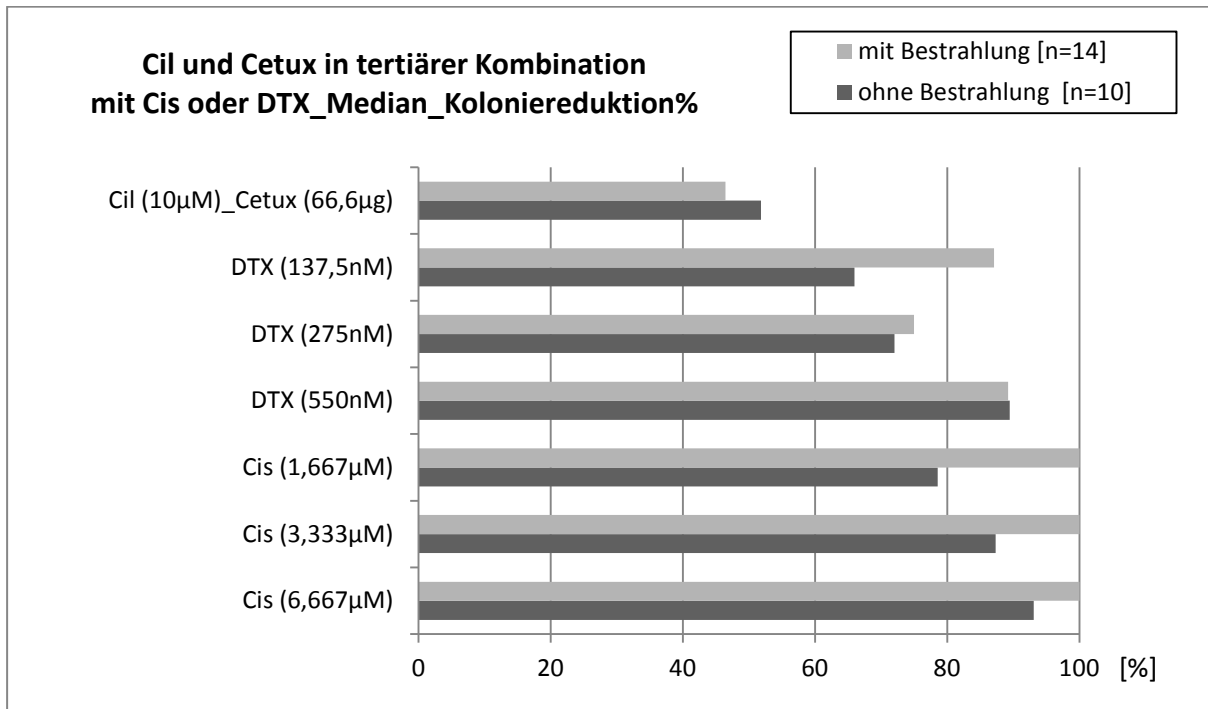


Abb.47 Vorteile einer Bestrahlung bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in Kombination mit den Chemotherapeutika Cil und Cetux in tertiärer Kombination mit Cis oder DTX in den Dosierungen 1, $\frac{1}{2}$ und $\frac{1}{4}$ TPL

In der quartären Kombination von Cil mit den bekannten Chemotherapeutika Cis, DTX und Cetux profitieren alle Kombinationen von einer zusätzlichen Bestrahlung und erreichen letztendlich die maximale Koloniereduktion von 100%. Die Kombinationen mit 3,333 µM Cis und 550 nM DTX und 275 nM DTX erreichen unter Bestrahlung zwar nicht die komplette Zellvernichtung von 100%, die Koloniereduktion wird jedoch ebenfalls um 34% verbessert (Abb.48).

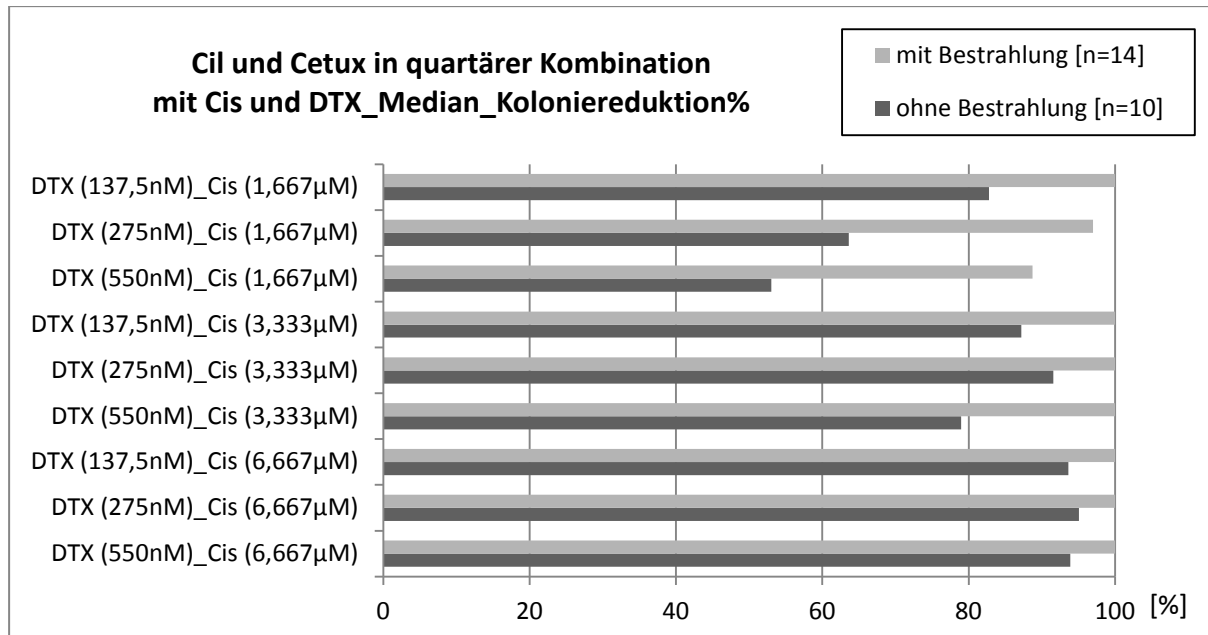


Abb.48 Vorteile einer Bestrahlung bezüglich Koloniereduktionsrate in Kombination mit den Chemotherapeutika Cil und Cetux in quartärer Kombination mit Cis und DTX in den Dosierungen 1, ½ und ¼ TPL

Zusammenfassend konnte in den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Koloniereduktion von Cil nach einer Einzeitbestrahlung mit 2,2 Gy gesteigert werden kann. Somit kann die in 1.8 beschriebene Aussage von Abdollahi et al. (2005), die besagt, dass ein Integrininhibitor wie Cil in der Lage ist, durch Inaktivierung der Proteinkinase B, auch *akt* genannt, eine Strahlenresistenz zu durchbrechen, mit den vorliegenden Ergebnissen verifiziert werden. Der Grund für die in manchen Fällen geringe Ausprägung könnte darin liegen, dass in der vorliegenden Arbeit nur eine Einzeitbestrahlung mit einer Dosis von 2,2 Gy durchgeführt wurde; die Forschergruppe um Abdollahi et al. verwendete jedoch die Methode der fraktionierten Bestrahlung mit 5 x 2,5 Gy und kam zu dem Schluss, dass Cil als Radiosensitizer zu gelten hat. Dieser Befund kann mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Hiermit wird die essentielle Notwendigkeit der Radiotherapie in Bezug auf HNSCC deutlich.

4.2 Bewertung der gewonnen Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode des FLAVINO-Assays angewandt, worauf das HNO-Labor der Universität Leipzig ein Patent besitzt. Primäres Ziel war es herauszustellen, ob dieser Test zuverlässig in der täglichen Routine anwendbar ist, auch für eine größere Patientenanzahl. Insgesamt wurden in dieser Studie 100 Tumorproben von 92 Patienten angezüchtet, wovon 41 Proben ein Koloniewachstum zeigten. Dieser Verlust von 59% ist durch den hohen Aufwand bedingt verbunden mit zahlreichen Störfaktoren wie zu geringes Proben-

gewicht und der Heterogenität der histologischen Proben selbst. Zum ersten Mal überhaupt wurden in der vorliegenden Arbeit 96er Mikrotiterplatten mit 4 verschiedenen Beschichtungen verwendet und auf Koloniebildungsverhalten bei verschiedenen Risikofaktoren (AJCC-Stadium, Alkohol- und Zigarettenkonsum und Tumorlokalisation) untersucht. Hierbei konnte bei allen Risikokonstellationen die Beschichtung mit Kollagen überzeugen. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Chemotherapeutikum Cil alleine und in Kombination mit herkömmlichen Zytostatika zu testen. Cil in der Dosierung 10 μM ist in der Lage das Koloniewachstum um 36% zu unterdrücken, in Kombination mit Cetux sogar um 44%. Das Chemotherapeutikum DTX kann in den Dosierungen 275 nM durch Hinzufügen von Cil die Koloniebildungsrate um rund 30% reduzieren. Die sehr gute koloniereduktive Wirkung von Cis kann in Kombination mit Cil nicht zusätzlich gesteigert werden. Ebenfalls wurde der Effekt einer Einzeitbestrahlung mit 2,2 Gy in der vorliegenden Arbeit an Mikrotiterplatten mit ECM-Beschichtung untersucht. Als Ergebnis kann man konstatieren, dass Cis in der Dosierung 3,333 μM von einer Bestrahlung profitiert mit einer zusätzlichen Koloniereduktion von 30%, wie auch die binäre Kombination Cil mit 3,333 μM Cis (+ 14%) oder die tertiäre Kombination mit Cil, Cetux und 1,667 μM Cis (+18%). Die vorliegende Studie konnte die Effizienz der in der HNO-Tumorthherapie verwendeten Chemotherapeutika und deren Kombinationen bestätigen und differenziert darstellen.

Zusammenfassend stellt der FLAVINO-Assay eine umfangreiche aber gut reproduzierbare Methode dar, um auch in der täglichen Praxis eine *Ex-vivo*-Chemoresponsetestung durchzuführen und somit innerhalb weniger Tage eine valide Aussage über die potentielle Wirksamkeit verschiedener Chemotherapeutika in unterschiedlicher Zusammensetzung zu treffen, vergleichbar etwa mit einem Antibiogramm.

5 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Der Einfluss des Integrin-Rezeptor-Inhibitors Cilengitide auf die *Ex-vivo* Chemoresponse von Kopf-Hals-Tumoren gegenüber Cisplatin, Docetaxel und Cetuximab im FLAVINO-Assay mit und ohne Bestrahlung

eingereicht von: Dr. med dent. Daphne Schlegel
22.08.82 , Stuttgart

angefertigt an der: Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-
und Ohrenheilkunde / Plastische Chirurgie
Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. A. Dietz,
Dr. rer. nat. G. Wichmann

Januar 2014

In Deutschland erkranken jährlich etwa 2.800 Frauen und etwa 7.600 Männer an malignen Kopf-Hals-Tumoren (Robert-Koch-Institut, 2010). Die überwiegende Zahl der Kopf-Hals-Tumore sind Plattenepithelkarzinome (*head and neck squamous cell carcinoma [HNSCC]*). Die Prognose dieser Patienten ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 65% schlecht, deshalb werden neue Therapieansätze in der klinischen Praxis geprüft. Nach wie vor besteht das Therapiekonzept von HNSCC aus einem multimodalen Therapieansatz, der neben chirurgischer Tumoresektion, Radiotherapie und Chemotherapie beinhaltet. In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Chemotherapie und hierbei wurde besonders der Einfluss des Integrin-Rezeptor-Inhibitors Cilengitide auf die Ex-vivo-Chemoreponse von Kopf-Hals-Tumoren gegenüber Cisplatin, Docetaxel und Cetuximab im FLAVINO-Assay mit und ohne Bestrahlung untersucht. Cilengitide (EMD 121974, Cyclo-L-Arg-Gly-L-Asp-D-Phe-N (me) L-Val, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) hat im Rahmen einer *targeted therapy* als Angriffsziel die Blockierung der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ und bewirkt damit eine Hemmung der Angiogenese (Link, 2009), des Tumorwachstums und der Zellregulation. Die Anzüchtung der

HNSCC erfolgte nach der patentierten Methode des FLAVINO-Assays (*short-time ex vivo colony-forming assay-flavin protecting conditions*). Dabei wird die Bildung von zytotoxischen Sauerstoffradikalen durch Verwendung eines Zellkulturmediums ohne Phenolrot, einem reduzierten Gehalt an Riboflavin und die Verwendung von ausschließlich monochromatischem Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 589$ nm verhindert. Zuerst wurde die Adhärenz der Tumorzellen und deren Koloniebildung bei verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) wie Laminin, Fibronectin, Kollagen und eine Zusammensetzung unterschiedlicher ECM mit Hilfe von 96er-Mikrotiterplatten untersucht. Einige ECM-Platten wurden zusätzlich mit einer Einzeldosis von 2,2 Gy bestrahlt. Nach Gegenfärbung mit einem fluoreszierenden Antikörper (Cy2TM-konjugierte Ziege-Anti-Maus-IgG; Jackson ImmunoResearch, Cambs, UK) wurden die Plattenepithelzellen anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Koloniebildungsverhalten von HNSCC

In der vorliegenden Studie wurden 100 HNSCC-Tumorproben von 92 Patienten, davon 12% weiblich und 88% männlichen Geschlechts, untersucht. 41 der 100 Tumorproben zeigten eine Koloniebildung unter dem Mikroskop und waren zu 60% dem AJCC-Stadium II zu zuordnen bzw. dem histologischen Grading 2. Bezüglich der Risikoanamnese wurde gezeigt, dass Tumorproben von Patienten ohne Nikotin- (50%) und Alkoholkonsum (71%) am besten anwachsen. Unterteilt nach Tumorlokalisation zeigen Oropharynxkarzinome in rund 50% der Fälle ein Koloniewachstum. Die anderen Lokalisationen (Hypopharynx, Larynx und Mundhöhle) zeigten eine Koloniebildungsrate von rund einem Drittel.

Koloniebildungsverhalten bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung

Die beste Adhärenz von HNSCC wurde auf der Beschichtung mit Kollagen (n=39) gefunden mit 16 ausgezählten Kolonien im Median, wenn man die bestrahlten ECM-Platten (n=14) mit 17 Kolonien im Median vernachlässigt. Im Vergleich zu den Beschichtungen hFN (7 Kolonien) und Laminin (6 Kolonien) sind auf Kollagen signifikant ($p < 0,001$) mehr Kolonien angewachsen (Wilcoxon-Test). Auf ECM-Platten konnten 13 Kolonien von HNSCC im Median ausgezählt werden. Nimmt man das AJCC-Stadium als Kriterium, so hat die Beschichtung mit Kollagen vor allem Vorteile bei den Stadien I, III und IVB. Tumore im Stadium II, IVA und IVC zeigen gute Koloniebildungsraten auf ECM-Platten. Bezüglich der Risikoanamnese wurde festgestellt, dass HNSCC von Patienten ohne Alkoholkonsum oder mit täglich 30-60 g Alkohol die beste Koloniebildungsrate auf Kollagen zeigte. Ein übermäßiger Alkoholkonsum

(über 60 g täglich) führt zu einer 66%-igen Stimulierung des Zellwachstums unter Bestrahlung mit einem Median von 27 Kolonien. Ein Zigarettenkonsum von mehr als 40 PY bzw. kein Zigarettenkonsum führt zu sehr guten Koloniebildungsraten auf Kollagenplatten. Die Adhärenz der HNSCC bezüglich Tumorlokalisation ist ebenfalls auf Kollagen sehr gut ausgeprägt, mit einer Ausnahme: Hypopharynxkarzinome zeigen leicht bessere Koloniebildungsraten auf ECM-Platten (+ 20%). Der Effekt der Repopulation unter Bestrahlung konnte sehr deutlich bei Karzinomen der Mundhöhle gezeigt werden, die mit einer Zellvermehrung von 70% unter Bestrahlung mit 2,2 Gy reagierten. Zusammenfassend zeigen somit die mit Kollagen beschichteten Platten im Median die höchsten Koloniebildungsraten.

Chemoresponsetestung von Cilengitide [Cil] und Cetuximab [Cetux]

Cil in der Verwendung von 10 μM unterdrückt die Adhärenz von HNSCC auf Kollagen um 23%, Cetux in der Dosierung von 66,6 $\mu\text{g/ml}$ kommt auf eine Koloniereduktion von 53%. Beide Chemotherapeutika in Kombination erreichen eine Reduktion der Koloniezahl um 60% und stellen nach Jin einen additiven Wirkungseffekt dar ($q=0,869$).

Chemoresponsetestung von Cisplatin [Cis] und Docetaxel [DTX]

Cis als sehr potente Monosubstanz in der Dosierung 1 TPL (*tolerated plasma level*) (6,667 mM) erreicht auf der Beschichtung mit Kollagen 96% im Median und damit eine fast vollständige Koloniereduktion von HNSCC. Reduziert man die Dosis von Cis, schwächt sich die Wirkung auf HNSCC linear ab bis auf 82% bei Cis in der Dosierung 1,667 μM . 550 nM DTX erreicht bei HNSCC eine Koloniereduktion von 66%, die bei halber Dosierung auf 48% abfällt und dann wieder auf ungefähr den Ausgangswert bei 137,5 nM DTX ansteigt. In der binären Kombination kann bei der Verwendung von 6,667 μM Cis in Kombination mit DTX eine Koloniereduktion von 100% erzielt werden. Wird die Cis-Konzentration reduziert, sinkt kontinuierlich auch die Koloniereduktionsrate, mit der Ausnahme bei 1,667 μM Cis in Kombination mit 275 nM DTX, bei der eine 99% Koloniereduktion erreicht wird. Laut der Jin-Formel wirken alle binären Kombinationen von Cis und DTX bei HNSCC auf Kollagen angewachsen additiv zueinander ($q=0,85-1,15$) und erreichen in der Kombination höhere Koloniereduktionsraten als bei einer Monotherapie.

Vorteile von Cilengitide [Cil] in binärer, tertiärer und quartärer Kombination

Auf der Kollagenbeschichtung erreicht Cil als Monotherapie bei HNSCC eine Koloniereduktionsrate von 23% und kann in Kombination mit Cis die gute koloniereduktive Wirkung von

Cis als Monotherapie nicht steigern. Anders hingegen verhält es sich mit DTX: hier erreicht die zusätzliche Gabe von Cil sehr gute Ergebnisse bei reduzierter Konzentration von DTX auf 275 nM (+ 27%) bzw. 137,5 nM (+10%). Wird DTX in der Dosierung 550 nM verwendet, bringt die zusätzliche Gabe von Cil ein Mehrwert von 12%. Cil mit 1,667 μ M Cis wirkt gering antagonistisch ($q=0,835$), wohingegen Cil mit 275 nM DTX synergistisch ($q=1,254$) wirkt. Alle anderen Kombinationen zeigen jeweils einen additiven Effekt laut der Jin-Formel. In tertiärer Kombination (Cil, DTX, Cis) profitieren nur zwei Kombinationen von der zusätzlichen Gabe von Cil: nämlich 275 nM DTX bzw. 550 nM DTX mit Cis in der Dosierung 3,333 μ M (~4%). In tertiärer Kombination (Cil, DTX, Cis, Cetux) bringt Cil in allen Kombinationen kein Plus bezüglich Koloniereduktion.

Einfluss einer Einzeitbestrahlung (2,2 Gy) auf Cilengitide

Die koloniereduktive Wirkung von Cil in Kombination mit Cis auf HNSCC kann durch eine zusätzliche Bestrahlung bei der Dosierung 3,333 μ M Cis und 1,667 μ M Cis nochmals um rund 20% gesteigert werden. Cil in Kombination mit 275 nM DTX kann ein Plus an Koloniereduktivität um rund 17% erzielen. Wird Cil tertiär kombiniert mit Cetux und Cis bzw. DTX kann ebenfalls das koloniereduktive Verhalten verbessert werden. Bei einer Dosisreduktion von Cis auf 1,667 μ M bzw. DTX bis auf 137,5 nM kann eine zusätzliche Bestrahlung die Koloniereduktion um 20% steigern. In der quartären Kombination von Cil mit den bekannten Chemotherapeutika Cis, DTX und Cetux profitieren alle Kombinationen von einer zusätzlichen Bestrahlung und erreichen letztendlich die maximale Koloniereduktion von 100%. Abdollahi et al. (2005) kamen zu der Erkenntnis, dass *akt*, auch Proteinkinase B genannt, welche eine Rolle als antiapoptotische Proteinkinase spielt, via Bestrahlung über den Phosphatidylinositol-3-Kinaseweg phosphoryliert und damit aktiviert wird. Integrinhibitoren wie Cilengitide können in Kombination mit Bestrahlung die antiangiogenetische Wirkung steigern und die *Akt*-Phosphorylierung verhindern. Cilengitide muss somit als potenter Radiosensitizer angesehen werden.

Zusammenfassend stellt der FLAVINO Assay eine gute und schnelle Methode dar, die auch in der täglichen Praxis eine *Ex-vivo* Chemoresponsetestung ermöglicht. Innerhalb weniger Tage kann eine valide Aussage über die potentielle Wirksamkeit verschiedener Chemotherapeutika in unterschiedlicher Zusammensetzung getroffen werden, vergleichbar mit einer Art Antibiotogramm. Zukünftige Untersuchungen müssen jedoch noch den potentiellen Gewinn für den einzelnen Patienten speziell evaluieren.

6 Literaturverzeichnis

- Abdollahi, A., Griggs, D., Zieher, H., Roth, A., Lipson, K., Saffrich, R., et al. (2005): Inhibition of $\alpha_v\beta_3$ Integrin Survival Signaling Enhances Antiangiogenic and Antitumor Effects of Radiotherapy. *Clin Cancer Res*(11), 6270-6279.
- Albeda, S., Mette, S., Elder, D., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., et al. (1990): Integrin distribution in malignant melanoma: association of the β_3 subunit with tumor progression. *Cancer Res.*(50), 6757-6764.
- Albelda, S., & Buck, C. (1990): Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J*(4), 2868-2880.
- Albert, J., Cao, C., Geng, L., Leavitt, L., Hallahan, D., & B., L. (2006): Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonist Cilengitide enhances efficacy of radiotherapy in endothelial cell and non-small-cell lung cancer models. *Int J Radiat Biol Phys*(65 (5)), 1536-1543.
- Alghisi, G., & Rüegg, C. (2006): Vascular Integrins in Tumor Angiogenesis: Mediators and Therapeutic Targets. *Endothelium*(13), 113-135.
- Bancroft, C., Chen, Z., Dong, G., Sunwoo, J., Yeh, N., Park, C., et al. (2001): Coexpression of Proangiogenic Factors IL-8 and VEGF by Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Involves Coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF- κ B Signal Pathways. *Clinical Cancer Research*(7), 435-442.
- Barth, J. (2008): Molekular zielgerichtete Therapien. *Krankenhauspharmazie*(29), 288-301.
- Bentzen, S., Thames, H., Turesson, I., Overgaard, M., & Van den Bogaert, W. (1990): Time-dose factors in radiotherapy: a review of the human data. *Radiother Oncol*, 19, 219-235.
- Bissett, D., Setanoians, A., Cassidy, J., Graham, M., Chadwick, G., Wilson, P., et al. (1993): Phase I an dpharmakokinetic study of Taxotere (RP 56976) administered as a 24-hour infusion. *Cancer Res.*, 523-527.
- Black, M., & Speer, F. (1953): Effects of cancer chemotherapeutic agents on dehydrogenase activity of human cancer tissue in vitro. *Am J Clin Pathol*(23), 218-227.
- Bonner, A., Harari, P., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D., Cohen, R., et al. (2006): Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*(354), 567-578.
- Boshard, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., & Hausen, H. (1984): A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.*(3), 1151-1157.

- Brat, D., Bellail, A., & Van Meir, E. (2005): The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology*, 2, 122-133.
- Buck, C., & Horwitz, A. (1987): Integrin, a transmembrane glycoprotein complex mediating cell-substratum adhesion. *J Cell Sci Suppl*(8), 231-250.
- Burke, P.A.; DeNardo, S.J.; Miers, L.A.; Lamborn, K.R.; Matzku, S.; DeNardo, G.L. (2002): Cilengitide Targeting of $\alpha v \beta 3$ Integrin Receptor Synergizes with Radioimmunotherapy to Increase Efficacy and Apoptosis in Breast Cancer Xenografts. *Canc Res*, 4263-4272.
- Burkhardt, D., Kalet, B., Coleman, M., Post, G., & Koch, T. (2004): Doxorubicin-formaldehyde conjugates targeting $\alpha v \beta 3$ integrin. *Mol Cancer Ther.*, 1593-604.
- Burtneß, B. (2005): The role of cetuximab in the treatment of squamous cell cancer of the head and neck. *Expert Opin Biol Ther.*(5), 1085-1093.
- Chen, Z., Malhotra, P., Thomas, G., Ondrey, F., Duffey, D., Smith, C., et al. (1999): Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Can Res*(5), 1369-1379.
- Clark, E., & Brugge, J. (1995): Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*(268), 233-239.
- Clark, R. (1990): Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. *J Invest Dermatol*(94), 128-134.
- Cohen, A., Veena, M., Srivatsan, E., & Wang, M. (2009): Suppression of Interleukin 6 and 8 Production in Head and Neck Cancer Cells With Curcumin via Inhibition of I κ B Kinase. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*(135), 190-197.
- Cordes, N., Helgans, S., & Eke, I. (2009): Adhesion, Invasion, Integrins and Beyond. In M. Molls, P. Vaupel, C. Nieder, & M. Anscher, *The impact of tumor biology on cancer treatment and multidisciplinary strategies*. Berlin: Springer, 93-115.
- Cree, I. (2009): Chemosensitivity and chemoresistance testing in ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 1(21), 39-43.
- Desoize, B., Berthiot, G., Manot, L., Coninx, P., & Dumont, P. (1996): Evaluation of a prediction model of cisplatin dose based on total platinum plasma concentration. *Eur J Cancer*, 10, 1734-8.
- Dietz, A. (2009): Aspekte der Chirurgie bei Kopf-Hals-Tumoren. *Onkologisch*(3), 1-15.
- Dietz, A., Boehm, A., Horn, I., Kruber, P., Bechmann, I., Golusinski, W., et al. (2010): Assay-based response evaluation in head and neck oncology: requirements for better decision making. *Eur Arch Otorhinolaryngol*(267), 483-494.

- Dietzsch, S., & Kortmann, R. (2009): Radiochemotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren. *Onkologisch*(3), 7-9.
- Dollner, R. (1999): *Universitätsbibliothek Heidelberg*. Abgerufen am 2010 von <http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/80>.
- Dollner, R., Granzow, C., Helmke, B., Ruess, A., Schad, A., Dietz, A., et al. (2004): The impact of stromal cell contamination on chemosensitivity testing of head and neck carcinoma. *Anticancer Res.*, 325-331.
- Dollner, R., Kopun, M., Dietz, A., Wiessler, M., & Granzow, C. (2002): Chemoreactivity profiling of HNSCC: Equipotentiality of platinum compounds and glufosfamide, a novel alkylating agent. *Proc Am Assoc Cancer Res*(43), 926.
- Duffy, S., Taylor, J., Terrell, J., Islam, M., Li, Y., Fowler, K., et al. (2008): Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer*(15), 750-7.
- Engvall, E., Jonsson, K., & Perlmann, P. (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta*, 427-34.
- Fowler, J. (1991): Rapid repopulation in radiotherapy: a debate on mechanism. The phantom of tumor treatment-continually rapid proliferation unmasked. *Radiother Oncol*, 22, 156-158.
- Fruehauf, J., & Alberts, D. (2003): Assay-Assisted treatment selection for women with breast or ovarian cancer. In: U. Reinhold, & W. Tilgen, *Chemosensitivity Testing in Oncology*. Berlin: Springer, 126-145.
- Garcia-Barros, M., Paris, F., Cordon-Cardo, C., Lyden, D., Rafii, S., Haimovitz-Friedman, A., et al. (2003): Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*(300), 1155-1159.
- Gey, G., Coffman, W., & Kubicek, M. (1952): Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*(12), 264-265.
- GLOBOCAN. (2002): www-dep.iarc.fr. Abgerufen am November 2009.
- Granzow, C., Drings, P., & Kopun, M. (1998): Identifizierung von Chemosensitivität bei menschlichen Tumorzellen durch flavinschützende Tests in vitro. In: P. Drings, & I. Vogt-Moykopf, *Thorax Tumoren*. Berlin: Springer, 329-332.
- Granzow, C., Kopun, M., & Kröber, T. (1995): Riboflavin-mediated Photosensitization of Vinca Alkaloids Distorts Drug Sensitivity. *Cancer Res.*(55), 4837-4843.

- Groner, B. (2007): The rationale for the development of targeted drugs in cancer therapy. In: B. Groner, *Targeted interference with signal transduction events*. Berlin: Springer, 1-3.
- Guntinas-Lichius, O. (2010): Epidemiologie der malignen Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland. *81. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für HNO* (Nr.15, 34. Jahrgang), 2.
- Harding, J., & Burtneß, B. (2005): Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs today*(41), 107-127.
- Hawkins, D., GW, D., & DA, G. (1996): Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res.*(56), 892-898.
- Hay, R., Caputo, J., Chen, T., Macy, M., McClintock, P., & Reid, Y. (1994): *ATCC Cell lines and Hybridomas*. (Bd. 8). Rockville Maryland: American type Culture Collection.
- Henkels, K., & Turchi, J. (1997): Induction of apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.*(57), 4488-4492.
- Hong, D., Lee, B., Lee, J., Choi, J., Wang, S., & Ro, J. (2009): Expression of VEGF, HGF, IL-6, IL-8, MMP-9, Telomerase in peripheral blood of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *clinical and experimental otorhinolaryngology*, 4, 186-192.
- Horn, I., Wichmann, G., Mozet, C., Dietz, A., Dollner, R., Tschöp, K., et al. (2009): Heterogeneity of epithelial and stromal cells of head and neck. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 1129-1139.
- Horn, I., Wichmann, G., Mozet, C., Dietz, A., Dollner, R., Tschöp, K., et al. (2010): Heterogeneity of epithelial and stromal cells of head and neck. *Cancer Chemother Pharmacol*(65), 1153-1163.
- Hynes, R. (2002): Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*(110), 673-687.
- Jones, S. (2005): Directing transition from innate to acquired immunity: Defining a role for IL-6. *J Immunol*(175), 3463-3468.
- Jubb, A., Oates, A., Holden, S., et al. (2006): Predicting benefit from antiangiogenic agents in malignancy. *Nat Rev Cancer*(6), 626-635.
- Kettembeil, S. (2009): Peptid-Puzzle. *Faszination Forschung*.
- Knoedler, M., Dietz, A., Gauler, T.C., Gruenwald, V., Keilholz, U., et al. (2013): Cetuximab, fluorouracil (5-FU), cisplatin, and docetaxel as first-line treatment in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (R/M SCCHN): Interim results of a randomized phase II clinical trial (CeFCiD). *J Clin Oncol* (31), abstr e17021.

- Krauss, G. (2000): *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- Lanz, H., & al., e. (1998): p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer and analysis of response and survival. *Clin. Cancer Res.*(4), 1243-1250.
- Lefebvre, J., & Ang, K. (2009): Larynx preservation consensus panel. Larynx preservation clinical trial design: key issues and recommendations-a consensus panel summary. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*(73), 1293-1303.
- Li S, S. K. (2005): Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*(7), 301-311.
- Li, A., Dubey, S., Varney, M., Dave, B., & Singh, R. (2003): IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J. Immunol*, 170(6), 3369-3376.
- Li, X., Chen, B., Blystone, S., McHugh, K., Ross, F., & Ramos, D. (1998): Differential expression of αv integrins in K1735 melanoma cells. *Invasion Metastasis*(18), 1-14.
- Link, H. (2009): Fortschritte in der Therapie bei Kopf-Hals-Tumoren. (S. M. GmbH, Hrsg.) *Onkologisch*(3), 1-4.
- Longley, D., Harkin, D., & Johnston, P. (2003): 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*(3), 330-338.
- Mainiero, F., Pepe, A., Yeon, M., Ren, Y., & Giancotti, F. (1996): The intracellular functions of $\alpha 6\beta 4$ integrin are regulated by EGF. *J Cell Biol*(134), 241-253.
- Max, R., RRCM, G., & Nooijen, P. (1997): Immunohistochemical analysis of integrin $\alpha v\beta 3$ expression on tumor-associated vessels of human carcinomas. *Int J Cancer*(71), 320-324.
- Merlano, M., Numico, G., Russi, E. G., Benasso, M., Colantonio, I., Vigna, R., et al. (2007): Cetuximab (C-mab) and chemo-radiation (CT-RT) for loco-regional advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (HNC): A phase II study. *J Clin Oncol* 25(25).
- Mestres-Ventura, P. (2003): Chemosensitivity Testing of Human Tumors Using Si-sensor Chips. In: U. Reinhold, & W. Tilgen, *Chemosensitivity Testing in Oncology*, Berlin: Springer, 26-38.
- Michalski, C., Erkan, M., Sauliunaite, D., Giese, T., Stratmann, R., Sartori, C., et al. (2008): Ex vivo chemosensitivity testing and gene expression profiling predict response

- towards adjuvant gemcitabine treatment in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 5(99), 760-767.
- Miyamoto, H., Murakami, T., Tsuchida, K., Sugino, H., Miyake, H., & Tashiro, S. (2004): Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas*(28), 38-44.
- Mojtahedi, Z., Khademi, B., Hashemi, S., Abtahi, S., Ghasemi, M., Fattahi, M., et al. (2011): Serum Interleukine-6 Concentration, But Not Interleukine-18, is Associated with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Progression. *Pathol. Oncol. Res.*, 7-10.
- Nabors, B., Mikkelsen, T., & al., e. (2007): Phase I and Correlative Biology Study of Cilengitide in Patients With Recurrent Malignant Glioma. *J Clin Oncol*(25), 1651-1657.
- Neubauer, H., Stefanova, M., Solomayer, E., Meisner, C., Zwirner, M., Wallwiener, D., et al. (2008): Predicting resistance to platinum-containing chemotherapy with the ATP tumor chemosensitivity assay in primary ovarian cancer. *Anticancer Res.*, 2A(28), 949-955.
- Nitsch, S., Pries, R., & Wollenberg, B. (2007): Head and neck cancer triggers increased IL-6 production of CD34+ stem cells from human cord blood. *In Vivo*, 493-8.
- Perez, C., Brady, L., Halperin, E., Wazer, F. C., & Prosnitz, L. (2007): *Principles and Practice of Radiation Oncology*. New York: Lippincott.
- Peters, L., Goepfert, H., Ang, K., Byers, R., Maor, M., Guillaumondegu, i. O., et al. (1993): Evaluation of the dose for postoperative radiation therapy of head and neck cancer: first report of a prospective randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*(26), 3-11.
- Pignon, J., Bourhis, J., Domenge, C., & al., e. (2000): Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma. *Lancet*(355), 949-955.
- Pigorsch, S. (2009): Intensitätsmodulierte Strahlentherapie mit Chemotherapie. (S. M. GmbH, Hrsg.) *Onkologisch*(3), 12-13.
- Rathore, R., Birnbaum, A., Rathore, B., DiPetrillo, T., Kennedy, T., & Ready, N. (2010): Carboplatin with weekly docetaxel and ifosfamide in advanced head and neck cancers. *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Reardon, D., Nabors, B., Stupp, R., & Mikkelsen, T. (2008): Cilengitide: an integrin-targeting arginin-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme. *Expert Opin. Investig. Drugs*(17), 1225-1235.

- Riedel, F., Zaiss, I., Herzog, D., Götte, K., Naim, R., & Hörmann, K. (2005): Serum Levels of Interleukin-6 in Patients with Primary Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *ANTICANCER RESEARCH*, 2761-2766.
- Righett, S., Perego, P., Corna, E., Pierotti, M., & Zunino, F. (1999): Emergence of p53 mutant cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells following drug exposure:spontaneously mutant selection. *Cell Growth Differ.*(10), 473-478.
- Robbins, K. T., Clayman, G., Levine, P. A., Medina, J., Sessions, R., Shaha, A., et al. (2008): *Neck dissection classification and TNM staging of head and neck cancer* (Bd. Third Edition).
- Robert-Koch-Institut. (2010): *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Berlin: RKI.
- Sanofi aventis. (2009): Taxotere Fachinformation. Frankfurt am Main.
- Sargent, J. (2003): The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumor samples. In U. Reinhold, & W. Tilgen, *Chemosensitivity Testing in Oncology*. Berlin: Springer, 13-25.
- Schmidt-Ullrich, R., Contessa, J., Dent, P., Mikkelsen, R., Valerie, K., Reardon, D., et al. (1999): Molecular mechanism of radiation-induced accelerated repopulation. *Radiat Oncol Invest*, 321-330.
- Schrag, D., Garewal, H., Burstein, H., Samson, D., Von Hoff, D., Somerfield, M., et al. (2004): American Society of Clinical Oncology Technology Assessment: chemotherapy sensitivity and resistance assays. *J Clin Oncol*(22), 3631-3638.
- Shakibaei, M., Csaki, C., & Mobasher, A. (2008): *Advances in anatomy, embryology and cell biology: Diverse Roles of Integrin Receptors in Articular Cartilage*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Siddik, Z. (2003): Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*(22), 7265-7279.
- Silletti, S., Kessler, T., Goldberg, J., Boger, D., & Cheres, D. (2001): Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alphavbeta3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*(98), 119-124.
- Singh, B., Li, R., Xu, L., Poluri, A., Patel, S., Shaha, A., et al. (2002): Prediction of survival in patients with head and neck cancer using the histoculture drug response assay. *Head Neck*(24), 437-442.

- Singhi, A., & Westra, W. (2010): Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*.
- Stupack, D., Cho, S., & Klemke, R. (2000): Molecular signaling of mechanisms of cell migration and invasion. *Immunol Rev*(21), 83-88.
- Stupp, R., & Ruegg, C. (2007): Integrin Inhibitors Reaching the Clinic. *Journal of Clinical Oncology*(25).
- Tamkun, J., DeSimone, D., Fonda, D., Patel, R., Buck, C., Horwitz, A., et al. (1986): Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*(46), 271-282.
- Tannapfel, A. (2008): Molekularpathologische Analyse des KRAS-Mutationsstatus beim metastasierten kolorektalen Karzinom. *Pathologe*(29), 93-96.
- Taylor, C., Sargent, J., Elgie, A., Williamson, C., Lewandowicz, G., Chappatte, O., et al. (2001): Chemosensitivity testing predicts survival in ovarian cancer. *Cur J Gynaecol Oncol*(22), 278-282.
- Thames, H., Withers, H., Mason, K., & Reid, B. (1981): Dose-survival characteristics of mouse jejunal crypt cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 7, 1591-1597.
- Twentyman, P., Fox, N., & Rees, J. (1989): chemosensitivity testing of fresh leukaemia cells using the MTT colorimetric assay. *Br J Haematol*(71), 19-24.
- Untch, M., Ditsch, N., Langer, E., Kurbacher, C., Crohns, C., Konecny, G., et al. (2003): Chemosensitivity Testing in Gynecologic Oncology - Dream or Reality ? In U. Reinhold, & W. Tilgen, *Chemoseinsitivity Testing in Oncology*. Berlin: Springer, 146-158.
- Van Waes, C. (1995): Cell adhesion and regulatory molecules involved in tumor formation, hemostasis, and wound healing. *Head Neck*(17), 140-147.
- Verbakel, W., Cuijpers, J., Hoffmans, D., Bieker, M., Slotman, B., & Senan, S. (2009): Volumetric intensity-modulated arc therapy vs. conventional IMRT in head-and-neck cancer: a comparative planning and dosimetric study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*(74), 252-259.
- Vermorken, J., Guigay, J., Mesia, R., Trigo, J., Keilholz, U., Kerber, A., et al. (2011): Phase I/II trial of cilengitide with cetuximab, cisplatin and 5-fluorouracil in recurrent and/or metastatic squamous cell cancer of the head and neck: findings of the phase I part. *Br J Cancer*, 1691-1696.

- Vermorken, J., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., et al. (2008): Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*(359), 1116-1127.
- Vermorken, J., Remenar, E., van Herpen, C., Gorlia, T., Mesia, R., Degardin, M., et al. (2007): Cisplatin, Fluorouracil, and Docetaxel in Unresectable Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*(357), 1695-1705.
- Wannemacher, M., Debus, J., & Wenz, F. (2006): *Strahlentherapie*. Berlin Heidelberg: Springer.
- Warburg, O., Geissler, A., & Lorenz, S. (1968): Wirkung von Riboflavin und Luminoflavin auf wachsende Krebszellen. *Z.Klin.Chem. Klin.Biochem.*(6), 467-468.
- Winer, E. (2009): ASCO stuft Cetuximab als einen der bedeutendsten Fortschritte 2009 in der Erstlinientherapie von Kopf-Hals-Tumoren ein. *J Clin Oncol*, 812-126.
- Withers, H., & Taylor, J. (1992): Critical volume model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 151-152.
- Wittekind, C., & Meyer, H.-J. (2010): *TNM, Klassifikation maligner Tumoren* (7. Ausg.). Weinheim: Wiley-Vch.
- Wittekind, C., & Meyer, H.-J. (2010): *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- Yarden, Y., & Sliwkowski, M. (2001): Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*(2), 127-137.
- Yla-Herttuala, S., Rissanen, T., Vajanto, I., & Hartikainen, J. (2007): Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol.*, 10, 1015-1026.
- Zhang, J., Yaping, L., Sun, J., Wenxian, L., Yuqiu, G., Xiaoming, Z., et al. (2009): Synthesis, cytotoxicity and DNA-binding levels of new type binuclear platinum(II) complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 4772-4777.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Verteilung der Tumorpatienten nach Lokalisation des Primarius (n=92).....	20
Abb.2	Tumorstadieneinteilung nach AJCC der 92 Patienten	21
Abb.3	angewachsene Plattenepithelkolonie nach Fluoreszenzfärbung	30
Abb.4	Abhängigkeit der Koloniebildung epithelialer Tumorzellen von dem AJCC-Stadium bei 100 Tumorproben	31
Abb.5	Abhängigkeit der Koloniebildung epithelialer Tumorzellen von dem Gradinggrad bei 100 Tumorproben.....	32
Abb.6	Abhängigkeit der Koloniebildung epithelialer Tumorzellen von dem Alkoholkonsum bei 100 Tumorproben	32
Abb.7	Abhängigkeit der Koloniebildung epithelialer Tumorzellen von dem Zigarettenkonsum bei 100 Tumorproben; NR=Nichtraucher; PY=pack years	33
Abb.8	Abhängigkeit der Koloniebildung epithelialer Tumorzellen von der Lokalisation des Primärtumors bei 100 Tumorproben	33
Abb.9	Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) sowie die prozentuale Verteilung in Bezug auf die bestrahlte ECM-Platte für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika	35
Abb.10	Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Mittelwerte für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika.....	36
Abb.11	Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Mittelwerte für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach AJCC-Stadium	37

- Abb.12 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach AJCC-Stadium 37
- Abb.13 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Mittelwerte für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach Alkoholkonsum..... 38
- Abb.14 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach Alkoholkonsum..... 39
- Abb.15 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Mittelwerte für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach Zigarettenkonsum 40
- Abb.16 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach Zigarettenkonsum..... 41

- Abb.17 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Mittelwerte für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach Tumorlokalisation des Primärtumors... 42
- Abb.18 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin) Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen in den als Referenz dienenden Kulturen ohne Therapeutika unterteilt nach Tumorlokalisation des Primärtumors..... 42
- Abb.19 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen unter dem Einfluss von Cil, Cetux und in Kombination..... 43
- Abb.20 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Mundhöhlenkarzinomen 45
- Abb.21 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Hypopharynxkarzinomen..... 46

Abb.22	Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Oropharynxkarzinomen	47
Abb.23	Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Larynxkarzinomen	48
Abb.24	Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cisplatin und Docetaxel in den Konzentrationen von 1 und ½ TPL	50
Abb.25	Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cisplatin und Docetaxel in binärer Kombination.....	51
Abb.26	Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von	

Tumortestungen bei den Zytostatika Cilengitide und Cisplatin in binärer Kombination.....	53
Abb.27 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cilengitide und Docetaxel in binärer Kombination.....	55
Abb.28 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy(ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cetuximab und Docetaxel in binärer Kombination.....	56
Abb.29 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cetuximab und Cisplatin in binärer Kombination.....	57
Abb.30 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cilengitide, Docetaxel und Cisplatin in tertiärer Kombination.....	59
Abb.31 Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin),Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit	

	Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cilengitide, Cetuximab und Cisplatin in tertiärer Kombination.....	60
Abb.32	Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cilengitide, Cetuximab und Docetaxel in tertiärer Kombination.....	62
Abb.33	Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cisplatin, Cetuximab und Docetaxel in tertiärer Kombination.....	64
Abb.34	Abhängigkeit der Bildung adhärenter epithelialer Kolonien von der Extrazellulärmatrix; gezeigt werden Median und Interquartilbereich (IQR) für humanes Fibronectin (hFN), humanes Laminin (Laminin), Kollagen I von Ratten (Kollagen) sowie ECM-Platten von Paesel+Lorei ohne (ECM) und mit Bestrahlung mit 2,2 Gy (ECM_B) für die angegebenen Zahlen von Tumortestungen bei den Zytostatika Cilengitide, Cisplatin, Cetuximab und Docetaxel in quartärer Kombination.....	66
Abb.35	Darstellung der Koloniereduktionsrate in Prozent [%] auf den Beschichtungen Kollagen und Laminin im Median bei den Chemotherapeutika Cilengitide und Cetuximab und beide in Kombination	71
Abb.36	Darstellung der Koloniereduktionsrate in Prozent [%] auf den Beschichtungen Kollagen und Laminin im Median bei den Zytostatika Cisplatin und Docetaxel bei unterschiedlichen Dosierungen	72
Abb.37	Darstellung der Koloniereduktionsrate in Prozent [%] auf den Beschichtungen Kollagen und Laminin im Median bei den Zytostatika Cisplatin und Docetaxel bei unterschiedlichen Dosierungen	72

Abb.38 Übersicht der Chemoresponsetestung im Median (Koloniereduktionsrate in %) bei allen 4 Chemotherapeutika (Cil, Cetux, DTX und Cis) auf der Beschichtung Kollagen im Vergleich zur korrespondierenden Koloniereduktionsrate auf der Beschichtung mit Laminin	74
Abb.39 Vorteile bezüglich Koloniereduktionsrate von Cil in binärer Kombination mit Cis und DTX für HNSCC auf Kollagen angezüchtet (n=20).....	75
Abb.40 Vorteile von Cil bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in tertiärer Kombination mit Cis und DTX auf der Beschichtung Kollagen (n=20)	76
Abb.41 Vorteile von Cil bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in quartärer Kombination mit Cetux, Cis und DTX auf der Beschichtung Kollagen (n=20).....	77
Abb.42 Vorteile von Cetux bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in binärer Kombination mit Cis oder DTX auf der Beschichtung Kollagen (n=20)	78
Abb.43 Vorteile von Cetux bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in tertiärer Kombination mit Cis und DTX auf der Beschichtung Kollagen (n=20)	79
Abb.44 Vorteile von Cetux bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in quartärer Kombination mit Cil, Cis und DTX auf der Beschichtung Kollagen (n=20)	80
Abb.45 Vorteile einer Bestrahlung bezüglich Koloniereduktionsrate in Kombination mit den Chemotherapeutika Cis oder DTX in den Dosierungen 1, ½ und ¼ TPL	81
Abb.46 Vorteile einer Bestrahlung bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Cil in binärer Kombination mit Cis oder DTX in den Dosierungen 1, ½ und ¼ TPL.....	81
Abb.47 Vorteile einer Bestrahlung bezüglich Koloniereduktionsrate in Prozent in Kombination mit den Chemotherapeutika Cil und Cetux in tertiärer Kombination mit Cis oder DTX in den Dosierungen 1, ½ und ¼ TPL	82
Abb.48 Vorteile einer Bestrahlung bezüglich Koloniereduktionsrate in Kombination mit den Chemotherapeutika Cil und Cetux in quartärer Kombination mit Cis und DTX in den Dosierungen 1, ½ und ¼ TPL	83

8 Tabellenverzeichnis

Tab.1	Stadieneinteilung nach AJCC	2
Tab.2	Alter der Patienten bei Probeentnahme.....	17
Tab.3	Übersicht der 92 Patienten mit Angabe der Patienten-Identifikationsnummer [Pat.-ID], des Alters, des Geschlechts, der TNM-Klassifikation, der Tumorstadieneinteilung nach AJCC-Kriterien (Robbins et al., 2008) sowie der Anzahl der angesetzten Mikrotiterplatten	18
Tab.4	IC ₅₀ der verwendeten Chemotherapeutika	29
Tab.5	Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei 4 Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination.....	44
Tab.6	Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei 4 Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Mundhöhlenkarzinomen	45
Tab.7	Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei 4 Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Hypopharynxkarzinomen.....	46
Tab.8	Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei 4 Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Oropharynxkarzinomen	47
Tab.9	Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei 4 Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) unter dem Einfluss von Cilengitide, Cetuximab und in Kombination bei Larynxkarzinomen	48
Tab.10	Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cisplatin und Docetaxel	49
Tab.11	Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cisplatin und Docetaxel in binärer Kombination.....	52
Tab.12	Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cilengitide und Cisplatin in binärer Kombination	53

Tab.13	Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cilengitide und Docetaxel in binärer Kombination	54
Tab.14	Mittelwert des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cetuximab und Docetaxel in binärer Kombination	56
Tab.15	Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cetuximab und Cisplatin in binärer Kombination	57
Tab.16	Mittelwerte des Koloniebildungsverhalten bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cilengitide, Docetaxel und Cisplatin in tertiärer Kombination	59
Tab.17	Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cilengitide , Cetuximab und Cisplatin in tertiärer Kombination	61
Tab.18	Mittelwerte des Koloniewachstums bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cilengitide, Cetuximab und Docetaxel in tertiärer Kombination.....	62
Tab.19	Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung bei den Zytostatika Cisplatin, Cetuximab und Docetaxel in tertiärer Kombination.....	63
Tab.20	Mittelwerte des Koloniebildungsverhaltens bei unterschiedlichen Beschichtungen und Bestrahlung (ECM_B) bei den Zytostatika Cilengitide, Cisplatin, Cetuximab und Docetaxel in quartärer Kombination.....	65
Tab.21	Jin-Ergebnisse [q] für die binären Kombinationen von DTX und Cis jeweils für die Beschichtungen Laminin und Kollagen; Synergismus ($q > 1,15$), Additivität ($q = 0,85 - 1,15$), Antagonismus ($q < 0,85$)	73
Tab.22	Jin-Ergebnisse [q] für die binären Kombinationen von Cil und Cis jeweils für die Beschichtung Kollagen; Synergismus ($q > 1,15$), Additivität ($q = 0,85 - 1,15$), Antagonismus ($q < 0,85$)	76
Tab.23	Jin-Ergebnisse [q] für die binäre Kombination von Cetux und Cis jeweils für die Beschichtung Kollagen; Synergismus ($q > 1,15$), Additivität ($q = 0,85 - 1,15$), Antagonismus ($q < 0,85$)	78

9 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

10 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Wichmann, der mir das Thema der Dissertation übertrug. Er stand mit seinem umfangreichen Wissen und methodischen Erfahrungen während der Erstellung dieser Arbeit zur Seite und unterstützte mich hilfreich bei allen Fragen und Problemen.

Einen ganz herzlichen Dank möchte ich an Herrn Prof. Dietz richten, der mich wissenschaftlich während der Erstellung der Dissertation unterstützte.

Mein Dank gilt dem ganzen HNO-Forschungslabor vor allem Frau Reiche und Frau Herrmann, die mir bei der Aufbereitung der Tumorproben geholfen haben.

Danke auch an die Mitdoktoranden Frau Cedra und Frau Gerhardt, die mir bei der Rekrutierung der Patienten zur Seite standen.

Für die finanzielle Unterstützung und Materialbereitstellung danke ich der Firma Merck.

Mein Dank gilt auch den 92 Patienten, die bereitwillig ihre Tumorproben zur Verfügung gestellt haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinem Freund für die Motivation und Unterstützung während der Erstellung der Dissertation danken.

11 Anhang

11.1 Pipettierschema

		H	G	F	E	D	C	B	A	DTX [TPL]	
Ohne Cetuximab	Cilengitide	1	0,5	0,25	0	0	0,25	0,5	1	1	1
		0/1	0/0,5	0/0,25	1/0	1/0	1/0,25	1/0,5	1/1	0,5	2
		0/1	0/0,5	0/0,25	0,5/0	0,5/0	0,5/0,25	0,5/0,5	0,5/1	0,25	3
		Cil	Cil	Cil	0,25/0	0,25/0	0,25/0,25	0,25/0,5	0,25/1	0,25	4
	ohne Cilengitide	0	0	0	0,25/0	0,5/0	0,5/0,25	0,5/0,5	0,5/1	0,5	5
		0/1	0/0,5	0/0,25	1/0	1/0	1/0,25	1/0,5	1/1	1	6
		0/1	0/0,5	0/0,25	1/0	1/0	1/0,25	1/0,5	1/1	0,5	7
		0/1	0/0,5	0/0,25	0,5/0	0,5/0	0,5/0,25	0,5/0,5	0,5/1	0,25	8
	Kontrolle	Cil/ Cetux	Cil/ Cetux	Cil/ Cetux	0,25/0	0,25/0	0,25/0,25	0,25/0,5	0,25/1	0,25	9
		Cetux	Cetux	Cetux	0,25/0	0,25/0	0,25/0,25	0,25/0,5	0,25/1	0,25	10
		0/1	0/0,5	0/0,25	0,5/0	0,5/0	0,5/0,25	0,5/0,5	0,5/1	0,5	11
		0/1	0/0,5	0/0,25	1/0	1/0	1/0,25	1/0,5	1/1	1	12
Cetuximab	ohne Cilengitide	DTX [TPL]	1	0,5	0,25	0	0,25	0,5	1	Cis [TPL]	